

***A *Drosophila melanogaster* Fcp1 foszfatáz  
szerkezetének és funkciójának vizsgálata***

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**Tombácz István**

**Témavezető:**

**Dr. Boros Imre**

**Biológus Doktori Iskola**

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémia és Molekuláris Biológiai Tanszék

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ

Biokémiai Intézet

**2009.**

**SZEGED**

## Tartalomjegyzék

<b><u>Tartalomjegyzék</u></b> .....	1
<b>I. Bevezetés</b> .....	2
I.1. Az RNS polimeráz II (RNAP II) .....	2
I.2. A CTD foszfatáz felfedezése .....	7
I.3. A CTD foszfatáz általános tulajdonságai.....	8
I.4. A CTD foszfatáz szabályzása a TFIIF és TFIIB által .....	10
I.5. A <i>Drosophila melanogaster</i> , mint modellorganizmus .....	10
<b>II. Célkitűzés</b> .....	12
<b>III. Anyagok és módszerek</b> .....	13
III.1. Rekombináns DNS konstrukciók.....	13
III.2. Élesztő két-hibrid kísérletek .....	14
III.3. Transzgenikus <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek létrehozása.....	15
III.4. Felhasznált <i>Drosophila</i> törzsek .....	16
III.5. Össz RNS kivonás <i>Drosophila</i> lárvákból, reverz transzkripció és PCR .....	16
III.6. <i>Drosophila</i> szárnydiszkusz festése acridin-orange festékkel.....	17
III.7. Humán (HeLa) sejt kultúra fenntartása és transzformáció.....	17
III.8. S2 sejt transzfekció.....	18
III.9. Luciferázaktivitás mérése .....	18
<b>IV. Eredmények</b> .....	19
IV.1. A DmFcp1 azonosítása és klónozása .....	19
IV. 2. A DmFcp1 kölcsönhatása az Rpb4-gyel.....	21
IV. 3. A DmFcp1 <i>in vivo</i> vizsgálata .....	22
IV. 4. A DmFcp1 szint megváltoztatása apoptózishoz vezet .....	28
IV. 5. A csendesítő transzgén okozta apoptózis p53 függő útvonalon valósul meg .....	29
IV. 6. A DmFcp1 befolyásolja a transzkripciót HeLa sejtekben.....	31
IV. 7. A dmfcpl gén promoterének vizsgálata.....	33
<b>V. Eredmények megvitatása</b> .....	34
<b>VI. Összefoglalás</b> .....	38
<b>VII. Summary</b> .....	41
<b>VIII. Rövidítések jegyzéke</b> .....	43
<b>IX. Köszönetnyilvánítás</b> .....	44
<b>X. Irodalomjegyzék</b> .....	45

## I. Bevezetés

### **I.1. Az RNS polimeráz II (RNAP II)**

Az eukarióta szervezetekben a fehérjekódoló géneket az RNAP II írja át. Ez az alapvető enzim 12 alegységből áll (Rpb1-Rpb12), mérete kb. 0.5 MDa, az egyes alegységek szerkezetileg és funkcionálisan konzerváltak. Legnagyobb alegysége (Rpb1) a C-terminálisán egy sajátos domént tartalmaz, amit CTD-nek neveznek., és a Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser konszenzus heptapeptid tandem ismétlődéseiből áll [1, 2]. Az ismétlődések száma a különböző élőlényekben eltérő: *Plasmodium falciparum*-ban 17, *Saccharomyces cerevisiae*-ben 26, nematodákban 32, *Drosophila* fajokban 45 és emberben 52. Az ez idáig vizsgált állat-, növény- és gombafajok nagy többségében a heptapeptid túlnyomó része megfelel ennek a konszenzus szekvenciának, de pl. emberben, bár az első 26 szoros egyezést mutat, a második 26-ban csak három heptapeptid egyezik meg [2]. A disztális részek változatossága talán a génexpresszió szabályozásában lehet fontos. A két prolin nagymértékben konzervált az 52 ismétlődésben, és fontos szerepet játszik a megfelelő térszerkezet kialakításában, valamint a más fehérjékkel való kölcsönhatásban. A tirozin is tökéletesen konzervált az emlős RNAP II-ben, fontosságát mutatja, hogy mutációja letális élesztőben. A legnagyobb változatosságot a hetes pozícióban található szerin mutatja [3]. A CTD-ben található aminosavak reverzibilis poszttranszlációs módosításokon mehetnek keresztül, pl. foszforiláció, glikoziláció és prolin-izomerizáció. A CTD-vel kölcsönhatásba lépő fehérjék alapvető folyamatokban vesznek részt: RNS érésben és transzkripció-szabályozásban, kromatinszerkezet-átrendezésben, DNS javításban, fehérje lebontásban és kis nukleáris RNS módosításban [4, 5]. Ezek után nem meglepő, hogy a CTD a sejtek életbenmaradásához nélkülözhetetlen, és 1985-ös felfedezése óta a transzkripció-szabályozás kutatásának egyik legintenzívebben vizsgált objektuma; sok tanulmány látott napvilágot szerkezetét és funkcióját illetően.

A CTD dinamikus, reverzibilis módosítása alapvető fontosságú a hatékony és pontos mRNS szintézishez. A transzkripció szabályzásában és a termék érésében szerepet játszó faktorok megfelelő időben történő kölcsönhatása nagyban függ a CTD-n jelenlévő módosításoktól. A CTD foszforilációja elősegíti például az mRNS 5' végi sapka-struktúrájának és 3' végi poliA farkának kialakítását végző enzimek kapcsolódását. Ezen megfigyelések azt sugallják, hogy a heptapeptid ismétlődések változatos módosításai egyfajta kódként szolgálnak, mely a különböző fehérjék kapcsolódását időben irányítja [6, 7]. *In vivo*

kísérletekben kimutatták a tirozin, treonin és mindhárom szerin foszforilációját, a szerinek és treoninok glikozilációját és a két prolin izomerizációját, tehát a CTD minden aminosava módosulhat. Ez nagyszámú jelkombinációt tesz lehetővé, és mintegy bináris kódként olvasható.

Számos vizsgálat bebizonyította, hogy a CTD nagymértékben foszforilálódhat. A foszforiláltság foka nem állandó, hanem dinamikusan változik [8-11]. Az RNAP II-nek két, mobilitása folytán jól elkülöníthető konformációs állapota van: az RNAP IIO (hiperfoszforilált) és az RNAP IIA (hipofoszforilált). Mivel az RNAP IIO és IIA formának más a funkciója a transzkripció során, ezért a CTD kinázoknak és foszfatáz(ok)nak – melyek a CTD foszforiláltsági fokát szabályozzák – rendkívül fontos szerepük van a génexpresszió szabályozásában. A IIA formában az enzim képes a promoterhez kötődni, és más faktorokkal kapcsolódva létrehozni a preiniciációs komplexet [12-14]; a foszforiláció gátolja ezt a folyamatot. Ellenben az elongációt a hiperfoszforilált IIO forma végzi [8, 15], tehát a transzkripció ciklus során a CTD foszforilálódik [15, 16]. A heptapeptid ismétlődés 5 aminosava (Y1, S2, T4, S5, S7) lehetséges foszforilációs hely, ám *in vivo* a szerinek foszforilációja a legnagyobb mértékű [17, 18]. Az hiperfoszforilált emlős CTD átlagban kb. 1 foszfátcsoportot tartalmaz ismétlődésenként, de a CTD-n adott időben jelenlévő foszfátcsoportok számát még nem határozták meg [19].

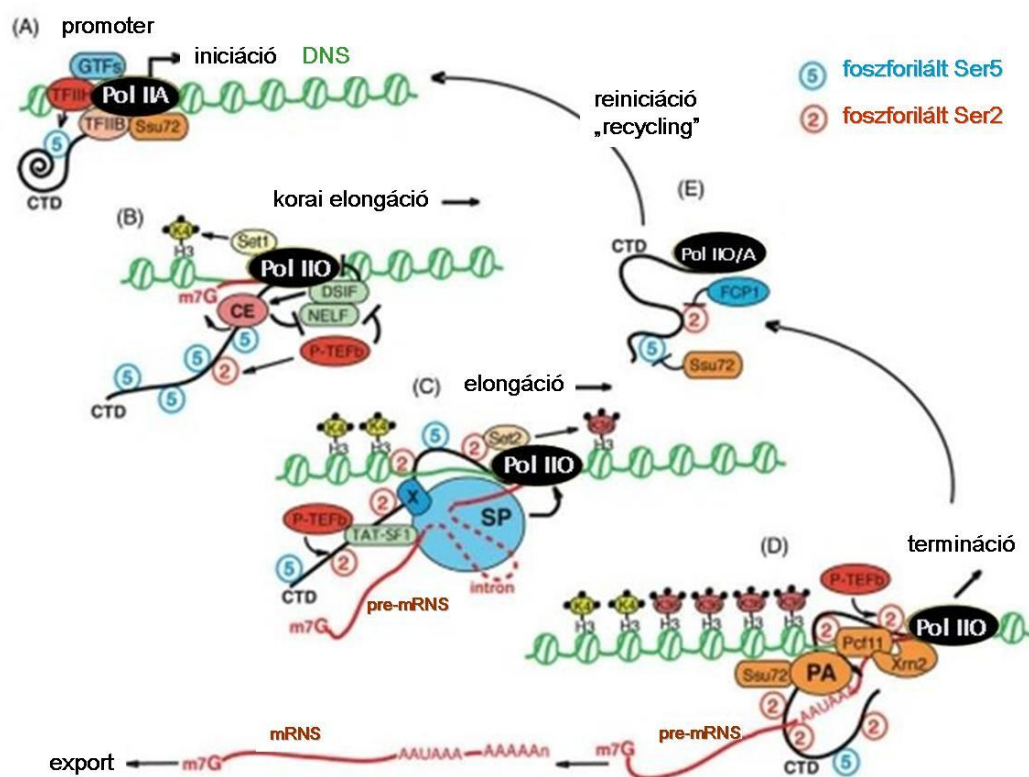
A CTD foszforiláció szerepének tisztázását a különböző szerineken foszforilált heptapeptideket felismerő ellenanyagok nagyban segítették [5, 20]. A foszforilált Ser2-t vagy Ser5-öt felismerő ellenanyagokat írták le először [21], ennek megfelelően ezen aminosavak foszforilációját vizsgálták legkimerítőbben [6]. Élesztőgombákban és emlősökben megfigyelték, hogy a foszforilációs mintázat ezen aminosavakon összefügg azzal, hogy az RNAP II a fehérjekódoló génnek mely részén helyezkedik éppen el [5]. A ciklinfüggő kináz 7 (Cdk7) – élesztőben kináz 28 (Kin28) – által végzett Ser5 foszforiláció a génnek 5' végének közelében a legnagyobb mértékű. *In vivo* vizsgálatok azt mutatják, hogy ez elősegíti a metilguanozin sapka kialakítását végző enzimek és az éretlen RNS-ek 5' végének térközelbe hozását. A Ser2 foszforilációjának szintje a génnek 3' vége felé emelkedik [9, 22, 23]; a Cdk9/Ctk1 – mely a pozitív elongációs faktor b (P-TEFb) komplex tagja – felelős ezért a módosításért. A Ser2-P-nak valószínűleg fontos szerepe van a korai elongációs blokk elkerülésében, és az RNAP II elongációs formájának kialakításában [24]. Ennek megfelelően, a P-TEFb inhibitorok befolyásolják a transzkripciót, intronkivágódást és poliadenilációt magasabb rendű eukarióták fehérjekódoló génjein, [25-27]. Ezen felül, *in vitro* kísérletekben kimutatták, hogy foszforilált Ser2 és Ser5-tel rendelkező CTD intronkivágódást és

poliadenilációt aktivál. Megfigyelték viszont, hogy az emlős p21 fehérjét kódoló gén transzkripciója elongációjához és RNS éréséhez nem szükséges P-TEFb aktivitás, ami azt sugallja, hogy a Ser-P nem minden esetben elengedhetetlen [23]. Itt fontos megemlíteni, hogy a Ser-P nem játszik szerepet az emlős snRNS-ek és a replikáció által aktivált hiszton gének transzkripciójának elongációjában. Ezek a gének viszonylag rövid RNS-eket kódolnak, melyek nem poliadenilálódnak, és nem tartalmaznak intronokat. A speciális, replikáció-aktivált hiszton mRNS feldolgozó szignál által szabályozott RNS 3' vég kialakítás is Ser2-P független. Ezzel szemben a Ser2-P fontos szerepet játszik az snRNS transzkriptumok 3' végi módosításában, amit egy génspecifikus 3' box szekvencia irányít [28].

A Ser2 és Ser5 dinamikus defoszforilációját CTD-specifikus foszfatázok végzik, így nagyban hozzájárulnak a foszforiláltsági mintázatban bekövetkező változásokhoz, valamint alapvetően fontosak ahhoz, hogy az RNAP II új transzkripciós ciklusba kezdhesen. A Ser2-P-t egy evolúciósan konzervált fehérje, az Fcp1 defoszforilálja, míg a Ser5-P-t az Ssu72 (élesztőben) és az SCP1 (emlősökben) [29]. Az Ssu72 mutációja a transzkripció hibás működését és a Ser5-P szint emelkedését okozza, ami alátámasztja azt a feltevést, hogy befolyásolja a CTD foszforilációt a transzkripció alatt [30].

CTD ellenes ellenanyagokkal *in vivo* kimutatták, hogy a Ser7 szintén foszforilált snRNS gének és egyes fehérjekódoló gének transzkripciója során. Ez a jelzés tovább bonyolítja a CTD kódot. Megfigyelték, hogy a Ser7-P szintje, a Ser2-P-hez hasonlóan, a gének 3' vége felé tetőzik, azt sugallva, hogy a Ser7-P-nak a 3' vég módosításában és/vagy a transzkripció terminációban van szerepe. Ennek ellenére a Ser7 alaninnal való helyettesítésének nincs jelentős hatása az endogén vagy tranziens transzfekcióval bejuttatott fehérjekódoló gének átírásában, viszont lényegesen gátolja a humán snRNS gének transzkripcióját és 3' vég módosítását, ami arra utal, hogy a CTD kód legalább egy eleme génspecifikusan működik [20, 31].

Az erősen konzervált Tyr1 is lehetséges foszforilációs hely, és *in vivo* tirozin foszforiláció ki is mutatható [18], de eddig még nem tisztázott a funkciója, hasonlóan a treonin foszforilációjához [17]. Mivel az emlős CTD-ben 15 treonin fordul elő a 2-es, 5-ös vagy 7-es pozícióban (a konszenzus szekvenciától eltérően), így lehet, hogy ezek szolgálnak foszforilációs helyként, és nem a Thr4.



### 1. ábra

#### A CTD foszforilációs ciklusa

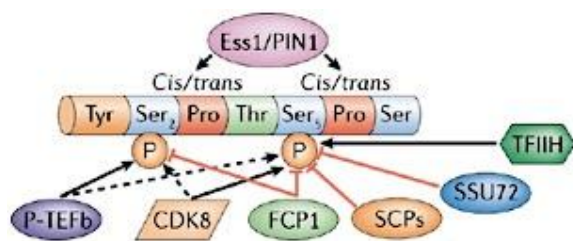
(Y. Hirose and Y. Ohkuma, *Phosphorylation of the C-terminal Domain of RNA Polymerase II Plays Central Roles in the Integrated Events of Eucaryotic Gene Expression*, J Biochem 2007 141: 601-608;)

Gerincesekben a CTD utolsó ismétlődését további 10 aminosav követi [2], melyek állandóan foszforilált kazein kináz II (CKII) helyet tartalmaznak. Ezen aminosavak eltávolítása a CTD lebomlását eredményezi, akadályozva a transzkripciót és az RNS érés folyamatát [32, 33]. Ezzel szemben a CKII célszekvencia mutációja nem befolyásolja a CTD stabilitását.

Minden konszenzus heptapeptid szekvenciában két peptidil-prolil kötés található, és ezek cisz vagy transz szerkezetűek lehetnek; ez négyféle térszerkezet kialakítását teszi lehetővé ismétlődésenként. Egy poliA jelzések felismeréséért felelős fehérjéről kimutatták, hogy csak olyan ismétlődésekhez kapcsolódik, amelyekben mindkét prolin transz helyzetű. Valószínűsíthető, hogy a kötéseket peptidil-prolil izomerázok (PPIáz) módosítják. A PPIáz

aktivitással rendelkező emlős Pin1 és az élesztő ESS1 feltételezhetően ilyen CTD módosító enzimek [34], mivel kölcsönhatnak a foszforilált CTD-vel, és specifikusak az olyan szubsztrátokra, melyekben a prolint Ser-P és Thr-P előzi meg. Az élesztő ESS1 mutációi akadályozzák a mRNS 3' vég kialakulását; emlősökben a Pin1 poliadenilációban betöltött szerepére nincs adat. Ez idáig nem sikerült egyértelműen kimutatni, hogy valamely, transzkripcióban vagy RNS érésben szerepet játszó faktor CTD-hez kötődését befolyásolná a prolin izomerizáció, bár a Pin1 az Fcp1 foszfatáz gátlásával befolyásolja a CTD foszforilációs állapotát, és ez negatívan hat a transzkripcióra [35].

Az emlős CTD glikoziláció útján is módosulhat: a szerin és treonin hidroxil csoportjaira N-acetilglükózamin (O-GlcNAc) kapcsolódhat [36]. Érdekes módon a IIO formán nem észlelhető glikoziláció, ami arra utal, hogy a foszforiláció és a glikoziláció egymást kizáró módosítások a CTD-n. Lehetséges, hogy a promoterekre a glikozilált forma köt be, majd egy N-acetilglükózaminidáz szelektíven eltávolítja az O-GlcNAc csoportot, mielőtt a foszforiláció megtörténne. Mindamellett ez idáig még nem sikerült egyértelműen bizonyítani, hogy az *in vivo* kimutatható alacsony szintű glikoziláció bármilyen szerepet betöltene a génexpresszióban.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

## 2. ábra

A CTD ismétlődés néhány lehetséges módosulása

(A. Saunders et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 557-567, August 2006)

Megemlítendő, hogy szoros kapcsolatot figyeltek meg a CTD kód és a hiszton kód között, mely szintén sok különböző reverzibilis módosításon keresztül alakul ki. Az átírt DNS-régió kromatinállapota és a CTD foszforilációs mintázata között összefüggést mutattak ki [37, 38]: élesztőben a Set1 és Set2 hiszton metiltransferázok a CTD Ser5-P és Ser2-P/Ser5-P-hez kapcsolódnak. Ennek megfelelően a H3K4 Set1 általi metilációja a génnek 5' régiójában a legmagasabb, míg a Set2 végezte H3K36 metiláció a 3' vég felé emelkedik [39]. Ezen felül a p300 hiszton-acetiltransferáz az RNAP IIA formához kapcsolódik, ami elősegítheti az iniciációs ponthoz kapcsolódást, míg egy másik hiszton-acetiltransferáz, a PCAF a IIO formát részesíti előnyben, ezzel valószínűleg az elongáció előrehaladásának kedvez [40, 41].

Bár még korántsem ismerünk minden részletet, a fentiekből látható, hogy a CTD módosítása rendkívül komplex, a transzkripcióban betöltött szerepe nem kevésbé összetett. A számos résztvevő faktor összehangolása időben és térben nagymértékű pontosságot kíván, így a CTD kód kialakításában szerepet játszó fehérjék vizsgálata alapvetően fontos és érdekes téma. A legintenzívebben kutatott terület a foszforilációs mintázat funkciója, és módosítása.

## **I.2. A CTD-foszfataz felfedezése**

CTD-foszfataz aktivitást először egy olyan kísérlet során észleltek, amelyben az RNAP II adenovírus 2 fő késői promoterhez (Ad2-MLP) való kötődését vizsgálták a CTD foszforiláltságának függvényében [14]. <sup>32</sup>P-jelölt RNAP IIA-t és IIO-t HeLa sejt kivonatok jelenlétében inkubálva azt tapasztalták, hogy a hipofoszforilált IIA forma kötődött a preiniciációs komplexhez, míg a IIO nem. Megfigyelték, hogy a IIO forma egy kis frakciója átalakult IIA-vá. Az így keletkezett IIA forma működőképes volt, mert beépült a preiniciációs komplexbe. Ez a kísérlet megalapozta azt a feltevést, hogy a HeLa sejt kivonatok CTD foszfataz(oka)t tartalmaz, és kiindulópontjául szolgált további vizsgálatoknak.

A CTD foszfataz tanulmányozásához szükség volt egy megfelelő vizsgálati rendszerre és egy alkalmas szubsztrátra. Az Rpb1 C-terminális felőli első szerinjét savas oldalláncok határolják, és szelektíven foszforilálható kazein kináz II-vel (CKII). Ez a szerin kívül esik az utolsó heptapeptid ismétlődésen, és foszforiláltsági állapota nem befolyásolja az RNAP II aktivitását. Tisztított RNAP IIA-t CKII-vel [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP jelenlétében jelölteni lehet, majd CTD kináz és feleslegben adott hideg ATP segítségével a megfelelő szubsztráttá alakítható [14, 42, 43], melyről a CTD foszfataz csak a jelöletlen foszfátcsoportokat távolítja el. Mivel a CTD foszforilálása az Rpb1 alegység jól látható mobilitásváltozásával jár egy SDS-PAGE során,



így a IIO pozícióból IIA-ba történő elmozdulás a foszfatázaktivitás közvetlen bizonyítéka. Újabb kísérletekben kimutatták, hogy a p-nitrofenil foszfát, mint mesterséges szubsztrát szintén alkalmas a CTD foszfatáz vizsgálatára.

### I.3. A CTD-foszfatáz általános tulajdonságai

Az előző fejezetben leírt vizsgálati rendszer segítségével sikerült HeLa sejtkivonatból egy 150 kDa nagyságú fehérjét tisztítani, amely a  $^{32}\text{P}$ -vel jelölt RNAP IIO-t defoszforilálta. A nagytisztaságú fehérjeelegyet denaturálták, frakcionálták SDS-PAGE-sel, a gélből kivágták, majd az egyes gél darabokból renaturálták a fehérjéket [44]. A CTD-foszfatáz aktivitást a 150 kDa-nak megfelelő sávból renaturált fehérjénél kapták vissza.

Az elsőként azonosított CTD-foszfatáz, az Fcp1, a jellegzetes DXDX(TV) motívummal rendelkező CTD-foszfatáz család prototípusa. Ortológjait megtalálták számos eukarióta modellorganizmusban. Működéséhez  $\text{Mg}^{2+}$ -t igényel, és ellenálló az okadaic savval szemben, ami a szerin/treonin foszfatáz 1, 2A és 2B protein-foszfatáz fehérjecsaldók hatékony gátlószere [42]. A  $\text{Mg}^{2+}$  függőséget igazolja az a megfigyelés is, hogy a hiperfoszforilált forma preparálásakor nagy mennyiségű EDTA és EGTA szükséges, hogy megkössék a  $\text{Mg}^{2+}$ -t, ezáltal gátolva a CTD-foszfatáz működését. [45].

A CTD-foszfatáz specifikusa több szempontból is érdekes. A CTD-foszfatáz a CTD-re nagymértékben specifikus. Még nem tisztázott, hogy képes-e defoszforilálni olyan fehérjéket, mint az SPT5, amelyek CTD-szerű ismétlődéseket tartalmaznak [46, 47], és szintén foszforiláltak [48]. (Az SPT5 a transzkripció-elongációban fontos szerepet játszik. CTD-jének foszforiláltsága szükséges az elongáció lezajlásához.) A CTD-foszfatáz defoszforilálja a szerin/treonin CTD-kinázok által létrehozott RNAP IIO-t [42], de ismert, hogy az RNAP IIO egy része *in vivo* foszforilált tirozinon is [18]. *In vitro* készített emlős RNAP IIO, amelyet c-Abl tirozin-kinázzal foszforiláltak, nem defoszforilálható a 150 kDa-os fehérjével (nem publikált adat, Chambers és Dahmus), valamint a CTD-foszfatáz nem érzékeny vanadátra, ami a tirozin foszfatázok ismert gátlószere. Ezen megfigyelések szerint létezik egy másik CTD-foszfatáz is, amelynek a CTD-n található foszfortirozinek a szubsztrátjai. A fenti vizsgálatokból arra lehet következtetni, hogy a CTD-foszfatáz szerinen és treoninon hat, és a RNAP II-re rendkívül specifikus.

Ahhoz, hogy pontosabban megvizsgálhassuk a CTD-foszfatáz aktivitását, érdemes áttekinteni a különböző CTD-kinázok specifikusát. A TFIIH általános transzkripció faktor a preiniciációs komplexhez kapcsolódik, és foszforilálja a CTD-t a transzkripció iniciáció alatt

[49-51]. Ez a változás megszünteti azokat a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, amelyek ahhoz kellenek, hogy az RNAP II a preiniciációs komplexbe kapcsolódjon, és ezáltal lehetővé teszi, hogy az elinduljon a promoterről. A korábban már említett P-TEFb az elakadt elongációs komplexek újraindításában és a folyamatos elongáció serkentésében játszik fontos szerepet [52, 53], valamint ellenállóvá teszi az elongációs komplexeket bizonyos gátló faktorokkal szemben, mint például a negatív elongációs faktor (NELF) [54]. A CTD-t foszforilálják egyéb, általánosabb fehérje kinázok is. Ilyen a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) is, amely környezeti stressz hatására és petesejtérés során foszforilál [55-57]. Az emlős sejtciklusban részt vevő, szabályzó szerepet betöltő Cdc2 kinázról szintén feltételezhető, hogy van CTD-kináz aktivitása is [58], és *in vitro* képes gátolni a transzkripciót [59]. Ezek az enzimek azon kívül, hogy a transzkripció ciklus más-más fázisaiban hatnak, még abban is különböznek, hogy a konszenzus szekvencián belül nem ugyanazokat az aminosavakat részesítik előnyben. Számos, mesterséges peptideket felhasználó kísérlet segítségével megállapították, hogy a TFIIH és a MAPK a CTD ismétlődés 5-ös pozícióban lévő szerinjét foszforilálja [60-62], míg a Cdc2 kináz a 2-es és 5-ös szerint egyaránt módosítja [17]. A preiniciációs komplexek vizsgálata során pedig azt tapasztalták, hogy a TFIIH az 5-ös, a P-TEFb a 2-es szerinen hat [63], bár a P-TEFb specifikitását a HIV-1 Tat fehérje képes olyan irányba változtatni, hogy az mindkét helyet foszforilálja. Újabb kutatások kimutatták, hogy az emlős CTD-foszfataz képes TFIIH, P-TEF, MAPK és Cdc2 által *in vitro* foszforilált RNAP II defoszforilálására (nem publikált adat, Lin és Dahmus), ezzel bizonyítva, hogy a szerin/treonin CTD-kinázok által létrehozott RNAP II a CTD-foszfataz szubsztrátja.

A CTD nélküli RNAP II és a hipofoszforilált RNAP IIA a CTD-foszfataz kompetitív inhibitorai [43]. Ez a megfigyelés azt valószínűsíti, hogy az RNAP II-n található egy CTD-n kívüli kötőhely az Fcp1 számára. A foszfatazreakció lejátszódására két modellt állítottak fel. A „docking-site” modell szerint a katalitikus aktivitáshoz szükséges a foszfataz CTD-n kívüli kötőhelyéhez kapcsolódása. Az még nem teljesen ismert, hogy ez a kölcsönhatás miként serkenti az enzim aktivitását. Lehetséges, hogy egyszerűen a foszfataz megfelelő helyen történő lokalizációját szolgálja, de az is előfordulhat, hogy feladata a fehérje megfelelő konformációjának kialakítása. Ezek ismeretében feltételezhető, hogy a CTD-foszfataz aktivitás a kötőhelyhez való kapcsolódáson keresztül szabályozódik. Újabb kimutatták, hogy a CTD-foszfataz az RNAP II Rpb4 alegységéhez kapcsolódik [64], és a „docking-site” modell alapján ez a kapcsolódás szükséges a foszfataz aktivitásához [43]. Ezzel ellentétben a „distributive” modell megkérdőjelezi az Fcp1-Rpb4 kapcsolódás funkcionális jelentőségét, az Fcp1 és a CTD között klasszikus enzim-szubsztrát kapcsolatot feltételez [65].

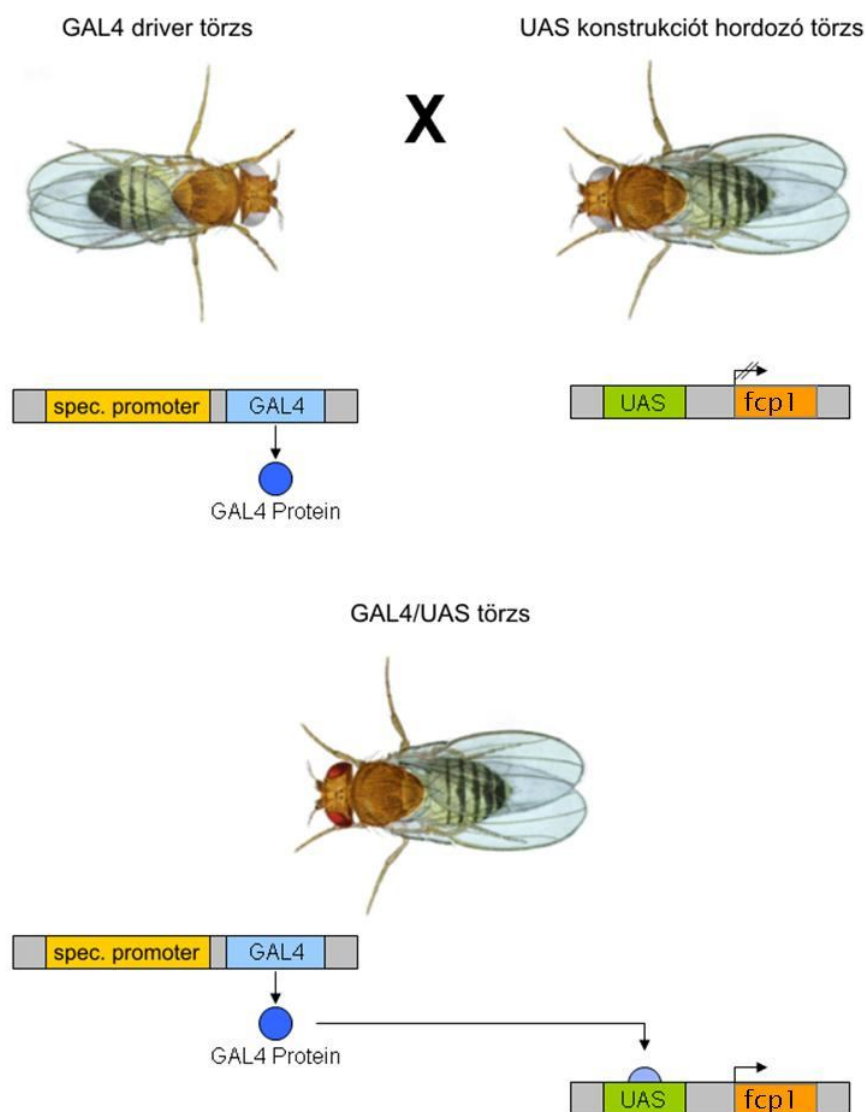
#### **I.4. A CTD-foszfataz szabályzása a TFIIF és TFIIB által**

A TFIIB, E, F, H és TBP vizsgálata során kiderült, hogy a CTD-foszfataz aktivitását serkenti a TFIIF, és ezt a serkentést gátolja a TFIIB. A humán TFIIF két alegységből áll, a 26 kDa-os RAP30 és az 58 kDa-os RAP74, melyek közül a RAP74 alegység felelős a serkentésért [43]. A CTD-foszfatazt a TFIIF-fel való kölcsönhatása alapján nevezték el Fcp1-nek (TFIIF-asszociált CTD-foszfataz). A TFIIF és TFIIB eltérő hatását magyarázza a két faktor transzkripcióban betöltött különböző szerepe. A TFIIB az iniciáció során a TFIIA és TFIID után kapcsolódik a promoterhez, majd elősegíti az RNAP II/TFIIF komplex kötődését. Elsődleges szerepe az, hogy meghatározza a transzkripció kiindulópontját [66]. Miután a TFIIF foszforilálja a CTD-t, az RNAP II elhagyja a promotert, de a TFIIB helyben marad. Lehetséges, hogy az iniciáció alatt a helyhez kötött TFIIB megakadályozza, hogy az Fcp1 hozzáférjen a CTD-hez. Mivel a foszfataz már a preiniciációs komplexbe beépül [67], ezért szigorúan szabályozott kell legyen, nehogy feleslegesen foszforilálódjon, majd azonnal defoszforilálódjon a CTD. Miután az RNAP II elhagyja a promotert, a TFIIF már szabadon befolyásolhatja az Fcp1 aktivitását, a TFIIB negatív hatása nélkül [68]. Bár a két faktor Fcp1-re gyakorolt hatásának pontos mechanizmusát még nem állapították meg, az ismert, hogy a TFIIF és TFIIB közötti kölcsönhatásért a TFIIF RAP74 alegységének C-terminálisa a felelős; ugyanaz a régió, ahol az Fcp1-el is kapcsolódik [69]. A TFIIB negatív hatását úgy fejt ki, hogy meggátolja a TFIIF és Fcp1 közti kapcsolatot [68].

#### **I.5. A *Drosophila melanogaster*, mint modellorganizmus**

A molekuláris genetikai tudományokban a *Drosophila melanogaster* az egyik leggyakrabban használt modellorganizmus. Ennek számos oka van, mint például: rövid élettartam, könnyű és olcsó fenntarthatóság, sok utód, változatos morfológiai markerek stb. A balanszerkromoszómák és a rendelkezésre álló genetikai módszerek nagy száma is kiváló kísérleti objektummá teszik. Funkciónyeréses és funkcióvesztéses mutációk előállítása lehetséges több módszerrel. Sokoldalúan használható lehetőség az is, hogy egy adott gén (illetve tetszőleges nukleotidszekvencia) túltermeltethető szövet-specifikusan és/vagy adott fejlődési stádiumban az UAS/GAL4 rendszer segítségével. A rendszer alapjait Fischer és munkatársai fedezték fel 1988-ban. Lényege a következő: A GAL4 egy 881 aminosavból álló, *Saccharomyces cerevisiae*-ben megtalálható fehérje, mely galaktóz által indukált géneket

szabályoz, oly módon, hogy a többsejtű eukarióták enhanszer elemeivel analóg Upstream Aktiváló Szekvenciákhoz (UAS) kapcsolódik. Fischer kimutatta, hogy egy UAS mögé épített tetszőleges gén aktivációja *Drosophila*-ban is lejátszódik GAL4 jelenlétében, és hogy a GAL4 jelenléte önmagában nem károsítja az állatokat [70]. Ez a két megfigyelés vezetett el Brand és Perrimon kísérleteihez, amikor az UAS/GAL4 rendszert célzott génexpresszióra használták [71]. A módszer az *in vivo* génműködés-kutatás egyik legjobban használható eszközévé vált.



**3. ábra**

Az UAS/GAL4 rendszer sematikus működése  
(<http://de.wikipedia.org/wiki/Gal4/UAS-System>)

## II. Célkitűzés

Vizsgálataim céljával az Fcp1 fehérje funkciójának, transzkripcióban betöltött szerepének megismerését tűztem ki. Az Fcp1 központi szerepe a CTD defoszforilációjában jól ismert, ám a pontos mechanizmus, ill. hozzájárulása a különböző részfolyamatok szabályozásához (pl. sapkázódás, intronkivágódás, poliadeniláció, stb.) még nem egyértelmű. Ezek pontos megértése nélkül nem alkothatunk teljes képet a transzkripcióról, azon keresztül a génexpresszió szabályozásáról. Kísérleteim középpontjába az Fcp1 *Drosophila melanogaster* ortológját állítottam. A *Drosophila* kiváló modellorganizmus, genetikai rendszere kidolgozott, egyszerűen kezelhető, és magasabbrendű eukariótaként a vizsgálatokból levont következtetések könnyebben párhuzamba állíthatóak pl. humán eredményekkel.

Mivel az Fcp1 *Drosophila melanogaster* homológjáról még nem közöltek adatokat, így első célom a DmFcp1 fehérje azonosítása és klónozása volt.

Az Fcp1 minden eukariótában megtalálható, funkciója konzervált, ezért érdekesnek tartottam megvizsgálni, hogy az egyes ortológok képesek-e hatást kifejteni heterológ rendszerben, tehát pl. a DmFcp1 befolyásolja-e a transzkripciót humán sejtekben.

Máig nem tisztázott, hogy az Fcp1 és Rpb4 közötti kölcsönhatásnak van-e jelentősége az Fcp1 működésében. Célul tűztem ki a *Drosophila* Fcp1 és Rpb4 közötti kölcsönhatás vizsgálatát, ill. annak megválaszolását, hogy az Fcp1 mely régiói szükségesek az Rpb4-gyel való kapcsolódáshoz.

Az Fcp1 funkcióját a fehérjeszint in vivo megváltoztatásával kívántam megvizsgálni, a dmfcpl gén transzgénekkel történő csendesítésével ill. túltermelésével.

### III. Anyagok és módszerek

#### **III.1. Rekombináns DNS konstrukciók**

A *dmfcp1* genomi és cDNS klónjait PCR segítségével állítottam elő két-két fragmentumként, az #1-#2 és #3-#4 primerpárokkal w1118 genotípusú állatokból származó genomi és cDNS templátból. A PCR termékeket minden esetben pTZ57R/T (Fermentas) vektorba klónoztam, amely kiválóan alkalmas a (Taq enzim által ráépített) 3' A túlnyúló véget tartalmazó PCR termékek beépítésére. A fragmentumok összeépítése egy átfedő, egyedi *NcoI* helyen történt. A genomi R251G pontmutáns klónt helyspecifikus mutagenézissel állítottam elő, az #5 és #6 primerek felhasználásával. A szekvenciák pontosságát szekvenálással ellenőriztem.

Konstrukciók élesztő két-hibrid kísérletekhez: A *dmfcp1* cDNS klónját *lexA* DNS-kötő (pBTM116), ill. *GAL4* aktiváló (pGAD424) domént tartalmazó vektorokba építettem *EcoRI* és *SalI* helyek felhasználásával. Az *Fcp1ΔBRCT* és a *BRCT* rövidített változatok szintén PCR-rel készültek (#10-#13, valamint #11-#12). Az egyéb deléciókat (*Fcp1* N- és C-terminális, ill.  $\Delta C$  fragmentum) megfelelő helyen található restrikciós hasítóhelyek (1571 bp-nál lévő *BalI* ill. 2123 bp-nál lévő *BglIII*) felhasználásával hoztam létre. A BTM116-Rpb4, BMT116-Ada2, GAD424-Rpb4 és GAD424-Ada2 konstrukciók korábban el lettek készítve más vizsgálatokhoz, így rendelkezésemre álltak.

Konstrukciók transzgenikus *Drosophila* törzsek készítéséhez: A *DmFcp1*-et és *DmFcp1R251G*-t túltermelő törzsek létrehozásához a *dmfcp1* megfelelő cDNS és genomi klónját pUAST vektorba építettem (pUAST-*fcp1c*, pUAST-*fcp1g* és pUAST-*fcp1g*<sup>R251G</sup>) *EcoRI* és *SalI* enzimekkel. A *dmfcp1* gént RNS interferencia segítségével csendesítettem: a genomi szekvencia 1271 – 2205 bp közötti fragmentumát (#7-#8 primerek) építettem a pWIZ [72] vektorba két kópiában, fej-fej orientációban *AvrII* ill. *NheI* helyre. A vektorról kifejeződő ssRNS önmagával hibridizálva egy hajtú struktúrát hoz létre, és az így létrejövő dsRNS RNS interferenciát indukál. A *Xenopus laevis fcp1* és *fcp1D181E* szekvenciák O. Bensaude-tól származnak, ezek túltermelésre alkalmas transzgént hordozó pUASP vektorba lettek építve.

Konstrukciók HeLa sejtvonal transzfekciójához: A *dmfcp1* megfelelő genomi klónját pcDNA3 emlős expressziós vektorba építettem (pcDNA3-*fcp1g* és pcDNA3-*fcp1g*<sup>R251G</sup>) *EcoRI* + *Bsp120I*, ill. *EcoRI* és *SmaI* hasítóhelyekkel.

Konstrukciók promoter-analízishez: Az eredeti pA3Luc-*fcp1*prom plazmidot Horváth András

készítette a dmfpcl gén előtti mintegy 700 bp hosszúságú szakasz PCR-rel történő felszorzásával (#16-#17 primer). A 495-1 (182-677), 396-1 (281-677), ill. 322-1 (355-677) rövidített változatok PCR-rel készültek az #18-#17, #19-#17 és #20-#17 primerek felhasználásával.

1.	Fcp1-Fw/EcoRI	GCGAGAATTCATGCAGAACATACCGGACGA
2.	Fcp1-PvuDn	ACATCCTCGCGATCGTCAAT
3.	Fcp1-PvuUp	CCATGGTGTGCATCATTGAC
4.	Fcp1-Rev/Sall	CGAGTCGACGGTGTTACAGATGCTACAGA
5.	Fcp1R251Gfw	CACGCGCCTGGGCCCGGCACCG
6.	Fcp1R251Grev	CGGTGCCGGGGCCAGGCGCGTG
7.	Fcp1-RiFw	CTGAGCTAGCGCGATGCCAAGGATCCAGAG
8.	Fcp1-RiRev	CTGAGCTAGCGGTGAAGACCAGCAGCGGAT
9.	Fcp1-Fw13	CAGTGAATTCCGTAAGCCTTGCGATGCAGA
10.	Fcp1-BFw	CAGCATATGGAGCACGTGGAGGAGA
11.	BRCTFw	CTAGAATTCCGGAGCGAAGTGCTGC
12.	BRCTRev	CATGTCGACCCAGCGCTCGGCGCAG
13.	Fcp1-BRev	CGGCATATGAATCTTCGAAACGATA
14.	rpL17aFw	GTGATGAACTGTGCCGACAA
15.	rpL17aRev	CCTTCATTCGCCCTTGTTG
16.	Fcp1promFw	CTATGGATCCTCGCGGTGCATGTAGC
17.	Fcp1promRev	GCATGTCGACTCGCAAGGCTTACGTT
18.	Fp1F	GGCATGGGTCCAATCCAGG
19.	Fp2F	GCGCTTCAGGTCTTCCTTG
20.	Fp3F	CGCCGATTAAACAGTGTTGG

**1. táblázat:** Felhasznált primerek

### III.2. Élesztő két-hibrid kísérletek

Fehérje-fehérje kölcsönhatások *in vivo* kimutatása *Saccharomyces cerevisiae* L40 törzs (MATa, his3 $\Delta$ 200, trp1-901, leu2-3112, ade2, LYS2::lexA-HIS3, URA3::lexA-lacZ gal4 gal80) felhasználásával.

Élesztő transzformálása:

1. élesztő növesztés 5 ml YPAD gazdag tápoldatban (1 literben: 20 g Peptone-Y; 10 g élesztő kivonat-Y; 20 g dextróz; 50 mg adenin 25 mg/ml törzsoldatból) éjszakán át, 30 °C-on
2. másnap továbboltás 50 ml YPAD-be, növesztés, míg a kultúra OD<sub>600</sub> értéke el nem éri a 0,4-0,6-ot

3. centrifugálás 2500 rpm-mel szobahőmérsékleten 5 percig
4. szuszpendálás 40 ml steril TE oldatban (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) felsuszpendáltam
5. centrifugálás 2500 rpm-mel szobahőmérsékleten 5 percig
6. az összegyűjtött élesztősejtek szuszpendálása 2 ml Li-acetát/0,5 TE (0,1 M Li-acetát; 5 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA) oldatban
7. inkubálás 10 percig szobahőmérsékleten
8. transzformálandó DNS hozzáadása; mintánként, 100 µl élesztőszuszpenzióhoz: 0,1 mg denaturált hordozó DNS, 0,5-0,5 µg pBTM116 ill. pGAD424 konstrukció (melyek természetesen tartalmazták a vizsgálni kívánt fehérjéket kódoló cDNS-t)
9. + 700 µl PEG/Li-acetát/TE oldat (40% PEG-3350; 0,1 M Li-acetát; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA)
10. inkubálás 30 °C-on 30 percig
11. + 80 µl DMSO
12. hősokk 42 °C-on 7 percig
13. sejtek összegyűjtése rövid centrifugálás (13000 rpm, 10 mp)
14. szuszpendálás 1 ml TE-ben
15. minták kettéosztása (0,5-0,5 ml), majd rövid centrifugálás
16. szuszpendálás: egyik mintasor 100 µl TE-ben, másik 50 µl TE + 70 µl hisztidin oldatban (50 mg/ml)
17. szélesztés TULLH lemezekre (1 literre: 1,2 g élesztő nitrogén bázis; 5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 10 g borostyánkősav; 6 g NaOH; 0,55 g TULLH teljes kiegészítő keverék; 2% glükóz + 2% agar)

### III.3. Transzgenikus *Drosophila melanogaster* törzsek létrehozása

1. a transzgéneket hordozó plazmidok injektálása dekorionizált w1118 embriókba 1 mg/ml koncentrációban, injektáló pufferben (5 mM KCl, 0.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.8), 0,5 mg/ml Δ2-3 transzpozáz enzimet expresszáló plazmiddal elegyítve
2. a kikelő állatokat keresztezése egyenként w1118 legyekkel
3. transzformánsok kiválogatása az utódok közül a transzgénekben lévő miniwhite szemszínmarker segítségével



### III.4. Felhasznált *Drosophila* törzsek

Az actin5c és hősokk GAL4 driver törzsek a Bloomington Drosophila Stock Center-ből, a daughterless, tubulin, armadillo, vestigial, escargot, engrailed és GMR GAL4 driver törzsek Szabad János (SZTE, ÁOK, Orvosi Biológiai Intézet) laboratóriumából származnak. A p53 null mutáns törzset Yikang S. Rong (NIH, Bethesda, USA), a pUAST-p53H159N törzset Michael W. Young (Rockefeller University, NY, USA) készítette.

### III.5. Össz RNS kivonás *Drosophila* lárvákból, reverz transzkripció és PCR

Mintánként 10 db L3 állapotú lárvát, vagy ennek megfelelő tömegű L2 állapotú lárvából vontam ki össz RNS-t.

1. minta homogenizálása 0,75 ml TRIzol<sup>®</sup>LS reagensben (Invitrogen)
2. + 0,2 ml DEPC-vel (dietil-pirokarbonát) kezelt víz
3. 5 perc inkubálás szobahőmérsékleten
4. + 0,2 ml kloroform
5. 5 perc inkubálás szobahőmérsékleten
6. centrifugálás 4 °C-on 10 percig 12000 g-n
7. + 0,5 ml izopropanol a felső, vizes fázishoz (kb. 0,5 ml)
8. 10 percig inkubálás szobahőmérsékleten
9. centrifugálás 4 °C-on 10 percig 12000 g-n
10. felülúszó eltávolítása, és a kicsapódott RNS-t mosása 1 ml 75%-os etilalkohollal
11. centrifugálás 7500 g-n 5 percig
12. felülúszó eltávolítása, és a csapadék szárítása szabad levegőn
13. visszaoldás 100 µl vízben

Reverz transzkripció:

1. 2 µg RNS templát + 0,2 µg random hexamer primer 11 µl végtérfogóban
2. inkubálás 70 °C-on 5 percig
3. + 4 µl 5x M-MuLV RT puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT) + 1 mM dNTP keverék 19 µl végtérfogóban
4. inkubálás 25 °C-on 5 percig

5. + 1  $\mu$ l (200 egység) M-MuLV reverz transzkriptáz (Fermentas)
6. inkubálás 25 °C-on 10 percig, majd 42 °C-on 60 percig

Semi-kvantitatív PCR:

2  $\mu$ l cDNS templát felhasználásával, 30 cikluson keresztül

### **III.6. *Drosophila* szárnydiszkusz festése acridin-orange festékkel**

Apoptotizáló sejtek láthatóvá tétele lárvális szövetben:

1. szárnydiszkusz preparálás L3 stádiumú lárvákból
2. inkubálás 1,6  $\mu$ g/ml koncentrációjú acridin-orange oldatban szobahőmérsékleten 5 percig
3. háromszori mosás PBS oldattal (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
4. kiértékelés fluoreszcens mikroszkóppal

### **III.7. Humán (HeLa) sejt kultúra fenntartása és transzformáció**

A HeLa sejteket DMEM (SIGMA) tápoldatban (+ 5% borjú szérum, 0,1 mg/ml streptomycin, 0,05 mg/ml ampicillin), 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett voltak növesztve, és kétnaponta passzálnak.

Transzformáció ExGen500 (Fermentas) reagenssel:

1. a transzformálandó DNS elegy (bejuttatni kívánt plazmidok, ill. „töltelék” plazmid DNS, mely arra szolgál, hogy minden minta azonos mennyiségű DNS-t tartalmazzon, így kiküszöbölve az esetleges, DNS mennyiségből származó toxikus hatást) feloldása 100  $\mu$ l 150 mM NaCl oldatban
2. megfelelő mennyiségű ExGen 500 reagens hozzáadása (3,3  $\mu$ l reagens/ $\mu$ l transzformálandó DNS), és azonnali keverés 10 mp-en keresztül
3. inkubáció 10 percig szobahőmérsékleten
4. a transzformáló elegy hozzáadása az előző nap szétosztott HeLa sejt kultúrához (mintánként  $2,5 \times 10^5$  db sejt)

5. inkubálás 37 °C-on
6. kiértékelés (luciferázaktivitás-mérés) 24 óra elteltével

### III.8. S2 sejt transzformáció

A *Drosophila* S2 Schneider sejteket Schneider (SIGMA) tápoldatban (+10% borjú szérum, 0,1 mg/ml streptomycin, 0,05 mg/ml ampicillin) 25 °C-on voltak növesztve, és kétnaponta passzálva.

Transzformáció kalcium-foszfát csapadékkal:

1. a bejuttatni kívánt DNS-t feloldása 250 µl vízben
2. + 25 µl 2,5M CaCl<sub>2</sub> oldat
3. az oldat cseppenkénti hozzáadása 250 µl HEPES pufferhez (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6,9) gyenge keverés mellett
4. 10 perc inkubáció szobahőmérsékleten
5. a transzformáló elegy hozzáadása az előző nap szétosztott S2 sejt kultúrához (mintánként 3x10<sup>6</sup> db sejt)
6. kiértékelés (luciferázaktivitás-mérés) 48 óra elteltével

### III.9. Luciferázaktivitás mérése

Luciferázt kifejező vektorral transzformált minták kiértékelése:

1. sejtek összegyűjtése
2. centrifugálás 13000 rpm fordulaton, 4 °C-on, 5 percig
3. + 200 µl Cell Culture Lysis Reagent-ben (Luciferase Assay System, Promega)
4. inkubálás 30 percig jégen
5. centrifugálás 13000 rpm fordulattal, 4 °C-on, 5 percig (sejttörmelék kiülepítése)
6. luciferázaktivitás mérése 20 µl sejtkivonat és 25 µl Luciferase Assay Substrate/luminol (Luciferase Assay System, Promega) felhasználásával Berthold Detection Systems Orion L luminométerben

## **IV. Eredmények**

### **IV.1. A DmFcp1 azonosítása és klónozása**

Az Fcp1 *Drosophila melanogaster* ortológját a BLASTP keresőprogram segítségével azonosítottam, a humán Fcp1-gyel mutatott homológia alapján. Az azonosított fehérje (Q9W147 – Swiss Protein Database) 880 aminosav hosszúságú, 35% azonosságot és 51% hasonlóságot mutat a hFcp1-gyel. Más Fcp1 ortológoknak megfelelően, a DmFcp1 is tartalmaz egy konzervált C-terminális foszfataz domént (CPD) és egy Brca-1 carboxil-terminális (BRCT) domént. Ezekben a régiókban a hasonlóság 75% és 60% a humán ortológhoz képest. **(4. ábra)** A DmFcp1-et a CG12252 gén kódolja, mely a második kromoszóma jobb karján helyezkedik el, a 60D5 citológiai régióban.

További vizsgálatokhoz a DmFcp1-et kódoló genomi és cDNS-t PCR-rel izoláltam.

D.m. MQNIPDEEGATPSRAPGGVAAAGAAEGDDGGGSSGAKNSASGNSNNNTSGGGIIVLRAALGENEARA  
X.I. -----MQNRRAREEGELSSQSGYCDVRFSG-----PRPL  
H.s. -----MEVPAAGRVPAGAPTAAVA EVRCPG-----PAPL

D.m. VINKWRVREGQFVSAAQILFLYQPVG-VDAKDAKDAGKPGG-----DCAIQRYKSRAGVVKRLRL  
X.I. RLVEWKVCPGASVQIGSVLALAVPVLGAEVVRSE-ETG---RPHRAPERKIKSDRAGVVQELCL  
H.s. RLLEWRVAAGAAVRIGSVLAVFEAAASAQSSGASQSRVASG GCVRPAR-PERRLRERAGVVRELCA

D.m. KEGELLTKGDAILELSEGIHTTVIKDMCADCGADLRONENGQ-----TSEASVPMVHTMPDLKVTQ  
X.I. KPGEVVPAGGVLVRLSSQNHVPVMKGLCAECGQDLTQLQSKNGKQVVPYSTATVSMVHSVPELMVSS  
H.s. QPGQVVAPGAVLVRLLEGSSHPVVMKGLCAECGQDLTQLQSKNGKQVPLSTATVSMVHSVPELMVSS

D.m. KLAQKLGHDDTRRLADRKLVLLVDLDQTLVHTTNDTVPDN-IGKIYHFQLYGPHSPWYHTRLRPGT  
X.I. EKAELGREDQFRLHRNDKLVLMVDLDQTLVHTTEQHCHMSRKGIFHFQLG-RGEPMLHTRLRPHC  
H.s. EQAELGREDQQLHRNRKLVLMVDLDQTLVHTTEQHCHMSRKGIFHFQLG-RGEPMLHTRLRPHC

D.m. AEFLEMSQLYELHICTFGARNYAHMIAQLLDPEGKFFSHRILSRDECFNATSKTDNLKALFPNGDS  
X.I. KEFLEKIAKLYELHVFTFGSRLYAHTIAGFLDPEKKLFSHRILSRDECIDPYSKTGNLRLNFP CGDS  
H.s. KDFLEKIAKLYELHVFTFGSRLYAHTIAGFLDPEKKLFSHRILSRDECIDPYSKTGNLRLNFP CGDS

D.m. MVCIIDREDVWNMASNLIQVKPYHFFQHTGDI NAPPGLSKHELDGEG--VDFKEITEKHGDKDKTE  
X.I. MVCIIDREDVWKFAPNLITVKKVYVFOGTGDI NAPPGSREAAQMSKVSCSKASEVTEKSEASQDS  
H.s. MVCIIDREDVWKFAPNLITVKKVYVFOGTGDMNAPPGSRESQTRKKVNHSRGTEVSEPS-PPVRDP

D.m. S-----SSEVKPEDTDKGDN-----  
X.I. EHAKDILVEEHSNGRRKAMKELNGGCTANSELTKKDTECSDELHEHDTSSHLTDVLNSKKVKSLAD  
H.s. EGVTAQPGVEPSNGLEKPARELNG---SEAATPRDSPRPGKPDERD-IWPPAQAPTSSQELAGAPE

D.m. -----TVTSTSKDDVNESVDVFEIGDAKDPEVSNASSATEAPKEPRDKLNGK  
X.I. TPPSLEQDERTNVSIPQPKTGAAKDLDFDLSSDSSEGETRKISSPSSASGSENECKRSWRKSNKKD  
H.s. PQGSCAQGGRVAPGQRPAAQATGTDLDFDLSSDSSESSSEGETKSSSSASDGESEKGRGRQKPKAAP

D.m. TNAEDIVVIDSSSGSPDAEKAASDGEDVVVIDDNSKESTKAEVPPTPAEKNEVVASSTTSPDEKRP  
X.I. EDCIASQELCTDDSKKARPENHSNLERPIFESKDTLPVEDDEMEVQSASLQDLGNGCTDKKEVEETE  
H.s. EGAGALAQGSSLEPGRPAAP-SLPGEAEPGAHAPDKEPELGGQEEGERDGLCGLGNGCADRKEAETE

D.m. SADADVATTSTKTPSLRAPLEGQKQ-IEIEDPDDYL LYLEVILRNILKRFYSIYD---ETTEIPDL  
X.I. SQNSESGITVGESLDQSMEEDEDESDTDEDDHLIYLEELVVRVHTDYAKYDRYLKKEVDVDPDI  
H.s. SQNSESGITVGESLDQSMEEDEDESDTDEDDHLIYLEELVVRVHTDYAKYDRYLKKEIFEAPDI

D.m. KVI VPKIRSEVLRSKNLVFSGLVPTQMKLEQSRAYFIAKSLGAEVK-----PNIDKEITHLVAVNA  
X.I. RNIVPELKSKVLENVITFSGLHPTNFPITERREFYHARALGANISKNLILKPDSDSRVTHLIAARS  
H.s. RKLVPELKSKVLADVAITFSGLHPTNFPITERREFYHARALGAKILTRIVLSPDAPDRATHLIAARA

D.m. GTYKVNAAKKEPAIKVVNANLWLTCAERWEHVEEKLFP LDRKVRNKGQPPAHCHSPEHVVNYSERS  
X.I. GTEKVRQAQNCCKHLHVNPPEWLWSCLERWEKVEEQLFP LKEDYTKSQRAISPTTFPDVQSASFQTPLF  
H.s. GTEKVLQAQECGHLHVNPDPWLWSCLERWDKVEEQLFP LRDDHTKAQRENSPAAFPDRREGVPPTALF

D.m. EISPSSSKQEEQSGNFRET LNPLVFTN-----ADIESM  
X.I. HPTPIHPKTQPGPEVHLVNPVTGKLIKQSGSSQSPYIQAPSPPLTLPVHGEHSSFRVQPHQEQL  
H.s. HPMPVLPKAQPGPEVRIYDSNTGKLIRTGARGP-----PAPSSSLPIRQEPSSFRAVPPQPQM

D.m. NKDYETFFESDSSSDESPVNFENPP-----MDKKLKRKREDDNSNRAHFFFTSRDD-----  
X.I. FDDEEPTANQDEEQSGPSRRKRQPSMSSEMPLYTLCKEDLESMDKEVDDILGEGSDSDSEKKKT  
H.s. FGEELP--DAQDGEQGPSRRKRQPSMSEMPLYTLCKEDLESMDKEVDDILGEGSDSDSEKR---

D.m. -----IMIGAPNLVEVDISSNEEADDNNEKEDDDDEMPSAKFRRGEDLPSDLELGSNSEKPEDE  
X.I. KVKKSQAAQGDKLKNPEERTETPSSSSSEKSLSGTRPRGHKRLKEEEEDAESVSSKESSENEDEEG  
H.s. RPEEQEEEPQPRKPGTRRERTLGAPASSERSAAGGRGPRGHKRLNEE--DAASESSRESSNEDE-G

D.m. DDGEWNMGAALEREFLGL EDFDM  
X.I. SSSEADEMAAAIEAELNDFI----  
H.s. SSSEADEMAKALEAELNDLM----

#### 4. ábra

*A Drosophila melanogaster* Fcp1 fehérje szekvenciájának összehasonlítása a humán és a *Xenopus laevis* Fcp1 ortológokkal

A vastagon bekeretezett aminosavak a CTD foszfatáz domént (CPD) alkotják, a pontozott vonal egy jellemző savas/hidrofób régiót, a szaggatott vonal a BRCT domént jelöli. A fekete csillag a DmFcp1 251-es argininjét mutatja, amelynek megfelelő aminosav a *S. pombe* homológban elengedhetetlen a fehérje foszfatázaktivitásához.

## IV. 2. A DmFcp1 kölcsönhatása az Rpb4-gyel

Korábban *S. pombe*-ban kimutatták az Fcp1 és Rpb4 közötti kölcsönhatást [64], ám újabb vizsgálatok megkérdőjelezzik ennek funkcionális jelentőségét [73]. Ennek fényében kíváncsi voltam, hogy az általam azonosított fehérje mutat-e kölcsönhatást az Rpb4-gyel, ezt élesztő két-hibrid módszerrel vizsgáltam, mely *in vivo* fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatására alkalmas.

A DmFcp1-et pBTM116 vektorba építettem be, amelyben a lexA DNS-kötő doménhez fuzionáltatjuk a vizsgált fehérjénket. Az Rpb4-et egy GAL4 aktivációs domént tartalmazó pGAD424 vektorba klónoztam. Meglepő módon a teljes hosszúságú Fcp1 kölcsönhatást mutatott a negatív kontrollal is, ami az Ada2 fehérje volt. Sőt, abban az esetben is pozitív jelet adott, ha kölcsönható partner sem volt a rendszerben. Megvizsgáltam melyik régió okozhatja ezt a hatást. A C-terminális rész ugyanúgy viselkedett, mint a teljes hosszúságú, viszont sem az N-terminális régió, sem a BRCT domén nem mutatott kölcsönhatást, ami arra utal, hogy a C-terminálison egy aktivációs domén található.

A kísérletet fordítva is elvégeztem, vagyis az Fcp1-et építettem össze GAL4 aktivációs doménnel a pGAD424 vektorban, és az Rpb4-et lexA DNS-kötő doménnel a pBTM116 vektorban. Ebben az esetben a teljes hosszúságú Fcp1 kölcsönhatott az Rpb4-gyel, míg a kontrollal nem. Ez a kölcsönhatás a C-terminális eltávolításának hatására megszűnt, amiből arra következtettem, hogy ez a régió felelős az Rpb4-gyel való kölcsönhatásért. **(5. ábra)**

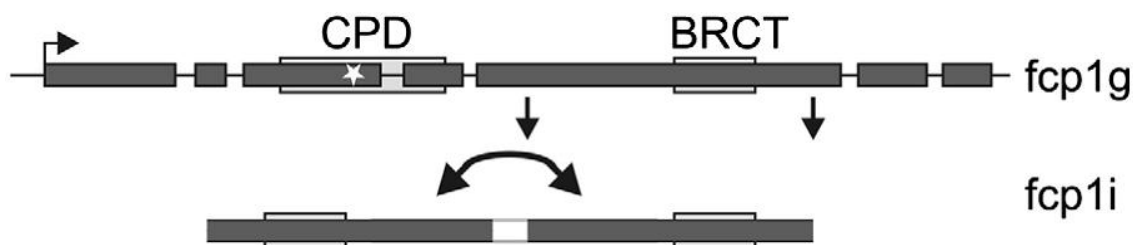
		AD-Rpb4	AD-ada2	AD
Fcp1		+	+	+
Fcp1 N-term.		-	-	-
Fcp1 C-term.		+	+	+
Fcp1ΔBRCT		+	+	+
BRCT		-	-	-
		DBD-Rpb4	DBD-ada2	
Fcp1		+	-	
Fcp1ΔC		-	-	

**5. ábra**

A DmFcp1 és DmRpb4 kölcsönhatásának vizsgálata élesztő két-hibrid módszerrel  
AD: aktivációs domén fúziók; DBD: DNS-kötő domén fúziók. A kölcsönhatás meglétét +, hiányát – jelöli.

#### IV. 3. A DmFcp1 *in vivo* vizsgálata

Mivel a Dmfcpl1 génnek nem álltak rendelkezésre ismert mutáns alléljai, ezért az *in vivo* vizsgálatokhoz a *Drosophila* munkákban gyakran használatos UAS-GAL4 rendszert használtam fenokópiák létrehozására. Ennek segítségével lehetőség nyílik egy adott nukleotidszekvencia fejlődési stádium- és szövetspecifikus expressziójára. Két típusú transzgént használtam a kísérletek során: csendesítő és túltermelő transzgént hoztam létre. **(6. ábra)** Előbbiről egy kettősszálú RNS transzkriptum képződik, mely az RNS interferencia okán az endogén mRNS szintjének csökkenéséhez vezet. A túltermelő transzgénnek több változatát is elkészítettem: teljes hosszúságú genomi Dmfcpl1 (UAS-fcp1g) ill. cDNS (UAS-fcp1c), valamint egy pontmutációt hordozó genomi Dmfcpl1 (UAS-fcp1gR251G). Ez az aminosavcsere egy olyan arginint változtat glicinre, mely a *S. pombe* ortológban elengedhetetlen a foszfatázaktivitáshoz. **(4. és 6. ábra)** A létrehozott konstrukciókkal homozigóta transzgenikus *Drosophila* törzseket hoztam létre.



**6. ábra**

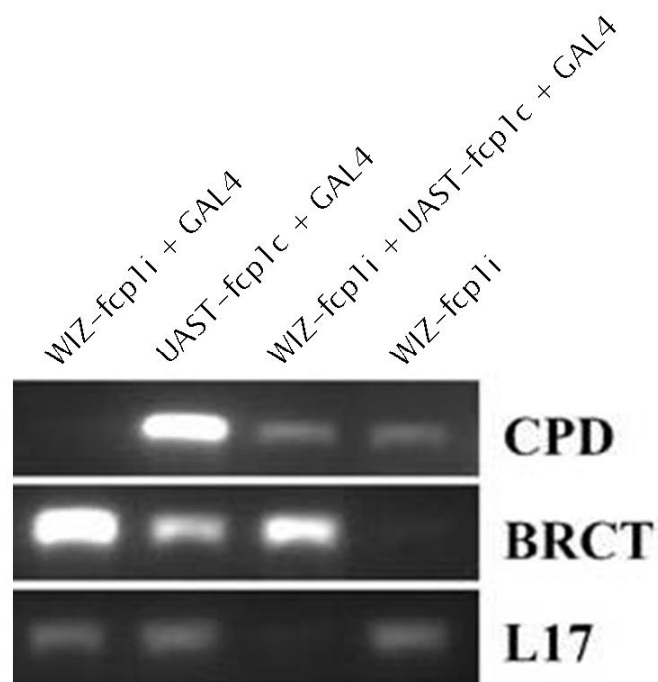
Az Fcp1-et túltermelő és csendesítő transzgénbe épített szekvenciák

Az fcp1g a dmfcpl1 teljes genomi szekvenciáját tartalmazza, a bekeretezett régiók a CTD foszfatáz domén és a BRCT domén. A csillag az R251G pontmutánsban megváltoztatott aminosavat jelöli. A csendesítő transzgénbe a legnagyobb, 5. exon 935 bp hosszúságú része került beépítésre két kópiában, fej-fej orientációban. Az orientációt a BRCT domén szemlélteti. A két kópia közötti szakasz a pWIZ vektorból származó intronszekvencia.

Az előállított transzgenikus törzseket az általánosan kifejeződő daughterless-GAL4 drivert hordozó legyekkel kereszteztem, és ellenőriztem, hogy a transzgének megfelelően működnek-e, azaz, hogy a kívánt RNS képződik-e róluk. L3 lárvá állapotú utódokból össz RNS-t vontam ki, erről cDNS-t készítettem, majd PCR-rel meghatároztam az állatokban lévő Fcp1 mRNS szintet. A használt primer párok az Fcp1 CPD és BRCT doménjére specifikusak. Összehasonlítva a nem meghajtott WIZ-fcp1i csendesítő transzgént tartalmazó állatokból származó mintát (kontroll) a GAL4 forrást is tartalmazó WIZ-fcp1i ill. a túltermelő UAST-fcp1 mintákkal, látható, hogy az Fcp1 mRNS mennyisége a transzgének hatására csökkent (WIZ-fcp1i), ill. nőtt (UAST-fcp1). A két transzgén együttes kifejeződésekor az mRNS mennyisége nem változott a kontrollhoz képest. **(7. ábra, CPD sor)** A BRCT domén jelen van a csendesítő transzgén által kifejezett szekvenciában is, így segítségével ellenőrizhető, hogy a transzgenekről GAL4 forrás jelenlétében kifejeződik-e a kívánt szekvencia. **(7. ábra, BRCT sor)**

Megvizsgáltam, hogy megváltoztatja-e az állatok fenotípusát, amennyiben ezeket a transzgéneket különböző GAL4 driverekkel kifejeztetem, mivel a megváltozott Fcp1 szint okozta fenotípusokból következtethetünk az Fcp1 működésére. A legyeket 25°C-on, ill. egyes keresztezések esetében 29°C-on is tartottam. Az UAS-GAL4 rendszer hatékonyságát befolyásolja a hőmérséklet, 29°C-on erősebb fenotípusokat kaphatunk. Az eredményeket táblázatban foglaltam össze, feltüntetve a driverek kifejeződési mintázatát. **(2. táblázat és 8. ábra)**





### 7. ábra

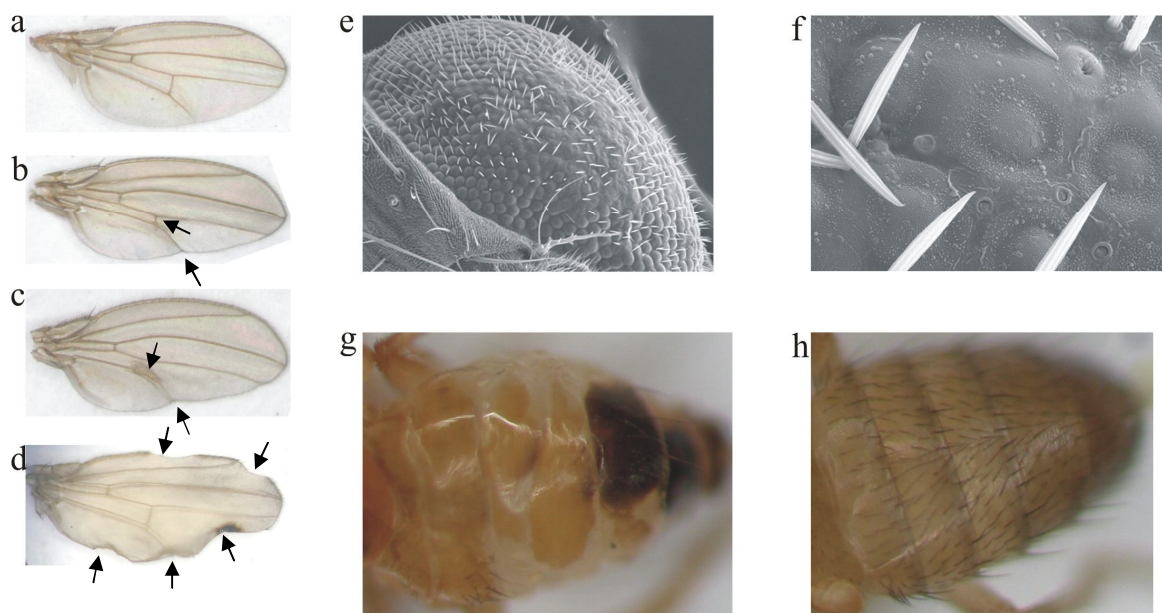
A *dmfcpl* mRNS szintje csökken a csendesítő, és nő a túltermelő transzgén hatására RT-PCR da-GAL4 driverrel kifejeztetett transzgéneket tartalmazó L3 lárvákból kivont össz RNS-en. A felső sorban a CTD foszfatáz doménre, míg a középsőben a BRCT doménre specifikus primerekkel készült RT-PCR eredménye látható. (A csendesítő transzgén által kifejezett fragmentum tartalmazza a BRCT domént is.) Az *rpL17a* riboszómaalkotó fehérjét kódoló génre specifikus primerekkel készült RT-PCR a mennyiségi kontroll.

GAL4 Driver	Driver kifejeződési mintázat	Fenotípus	
		pUAST-fcp1 (túltermelés)	pWIZ-fcp1i (csendesítés)
actin5c	általános	letális késő embrionális állapotban	letális L3-P1 állapotban
daughterless (da)	általános	letális L1-L2 állapotban	letális L2-L3 állapotban
tubulin (tub)	általános	vad típus <i>letális embrionális állapotban</i>	letális L2 állapotban <i>letális L2 állapotban</i>
armadillo (arm)	általános	vad típus <i>letális farát adult állapotban (50% penetrancia), a túlélők hajlott szárnyakkal rendelkeznek</i>	vad típus <i>gyűrött szárnyak (33% penetrancia)</i>
heat shock (hs)	általános/hő sokk indukált	letális L2-L3 állapotban	letális L3-P állapotban
vestigial (vg)	szárnydiszkusz	vad típus <i>vad típus</i>	kicsípett szárnyak (alacsony penetrancia) <i>kicsípett szárnyak (50% penetrancia)</i>
escargot (esg)	hisztoblasztok	letális bábállapotban	sérült tergitek / letális bábállapotban
engrailed (en)	szegmensek poszterior fele	kivágott szárnyak <i>letális bábállapotban (50% penetrancia), a túlélők gyűrött szárnyakkal rendelkeznek</i>	kivágott szárnyak <i>letális báb-farát adult állapotban</i>
GMR	szemdiszkusz	vad típus <i>vad típus</i>	vad típus <i>durva szem</i>

## 2. táblázat

A dmfcpl csendesítése és túltermelése következtében megjelenő fenotípusok összefoglalása

A normál betűtípussal írt fenotípusok a 25°C-on, míg a dőlt betűvel írtak a 29°C-on tartott keresztezések eredményeit tartalmazzák. Az L és P a különböző lárva- ill. bábállapotokat jelölik.



### 8. ábra

A *dmfcpl* csendesítése és túltermelése következtében megjelenő fenotípusok  
 Szárnyfenotípusok: **a**, vad típus; **b**, *en-GAL4/WIZ-fcpl1*; **c**, *en-GAL4/UAST-fcpl1c*; **d**, *vg-GAL4/WIZ-fcpl1*. Szemfenotípusok: **e-f**, *GMR-GAL4/WIZ-fcpl1* 29 °C-on. Tergitek: **g**, *esc-GAL4/WIZ-fcpl1*; **h**, vad típus

Érdekes módon mind a *Dmfcpl* csendesítése, mind a túltermelése letalitást eredményezett, amennyiben általánosan kifejeződő drivereket használtam. A szövetspecifikus driverek esetében is gyakran előfordult letalitás, vagy adott szervek aberráns megjelenése. A *cDNS*-t és a genomi *Fcp1*-et túltermelő transzgének által okozott fenotípusok között nem volt különbség.

Megvizsgáltam, hogy milyen változást okoz az állatok fenotípusában, ha a csendesítő (*WIZ-fcpl1*) és a túltermelő (*UAST-fcpl1c*) transzgéneket együtt fejeztetem ki. Ehhez azonos kromoszómára rekombináltattam, majd *aktin5c-GAL4* driverrel kifejeztettem. A két transzgén együtt nem okoz változást fenotípusban, az állatok életképesek, fertilisek, tulajdonképpen megegyeznek a vad típussal, vagyis a két transzgén együttes működése a vad típusához közeli *Fcp1* szintet állít be.

Annak eldöntésére, hogy a túltermelő transzgén által okozott fenotípusokért az Fcp1 foszfatázaktivitása-e a felelős, túltermeltettem az R251G pontmutánst. Ebben az esetben szintén a vad típussal megegyező fenotípust láttam tehát megállapítható, hogy a megnövekedett foszfatázaktivitás vezet az aberráns fenotípusokhoz.

Mivel az Fcp1 meglehetősen konzervált feladatot lát el, így érdekesnek tartottam megvizsgálni, hogy képes-e a csendesítést komplementálni egy másik fajból származó ortológ, úgy, ahogyan a DmFcp1 túltermelése. A *Xenopus laevis* Fcp1 ortológot egy túltermelő transzgénben (UASP-xfcp1) bejuttattam, majd a csendesítő transzgénnel együtt kifejeztettem. Az utódok nem mutattak hibás fenotípust, ám amikor a foszfatáz doménben pontmutációt hordozó D181E mutánst használtam (UASP-xfcp1D181E), akkor a csendesítő transzgénre jellemző fenotípus jelent meg (**3. táblázat**). Ez alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a *X. laevis* Fcp1 képes a DmFcp1 funkcióját ellátni, hiszen túltermelése menekíteni tudta a csökkent Fcp1 szint által okozott fenotípust, és a menekítés a foszfatázaktivitástól függött.

UASP-fcp1c & WIZ-fcp1i	vad típus
UASP-fcp1gR251G	vad típus
UASP-xfcp1	vad típus
UASP-xfcp1D181E	vad típus
UASP-xfcp1 & WIZ-fcp1i	vad típus
UASP-xfcp1D181E & WIZ-fcp1i	letális L3-P1 állapotban

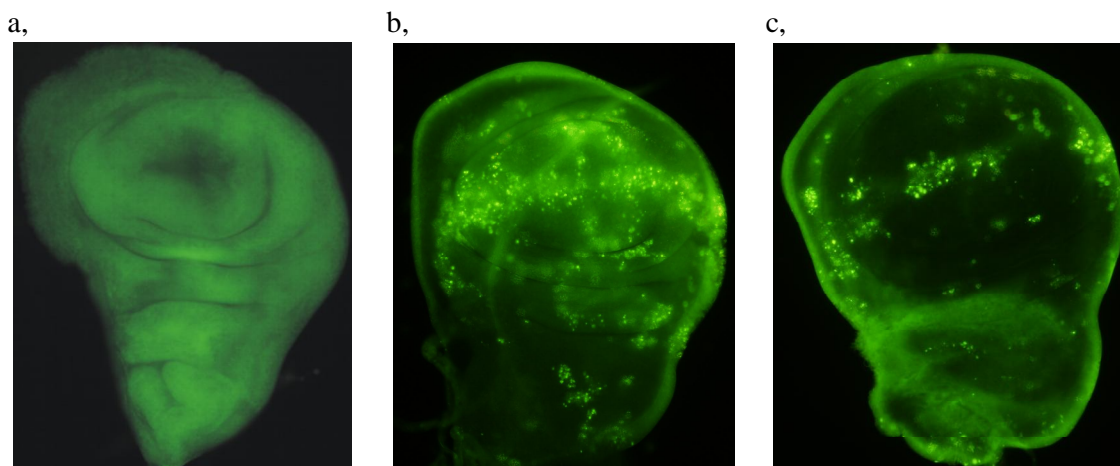
### 3. táblázat

Transzgén-kombinációk fenotípusa

Minden esetben actin5c-GAL4 drivert alkalmaztam.

#### IV. 4. A DmFcp1 szint megváltoztatása apoptózishoz vezet

A szövetspecifikus driverek használatakor tapasztalt fenotípusok – pl. roncsolódott szárnyak, hibás tergitek – arra engedtek következtetni, hogy az adott szövetben sejtpusztulás megy végbe. Szárnydiszkuszokat preparáltam olyan állatokból, melyekben a túltermelő ill. a csendesítő transzgén vestigial-GAL4 driverrel volt hajtva, majd acridin-orange festékekkel festettem őket, ami gyorsabban jut be az apoptotizáló sejtekbe, és UV fény hatására sárgászölden világít. Míg a vad típusú állatokból származó diszkuszban csak elvétve láthatók ilyen világító sejtek, addig a túltermelő és csendesítő transzgént tartalmazókban nagy számban figyelhetők meg. (9. ábra) Tehát megállapítottam, hogy a DmFcp1 szintjének megváltozásakor tapasztalható fenotípusok nagymértékű sejthalál következményei.



**9. ábra**

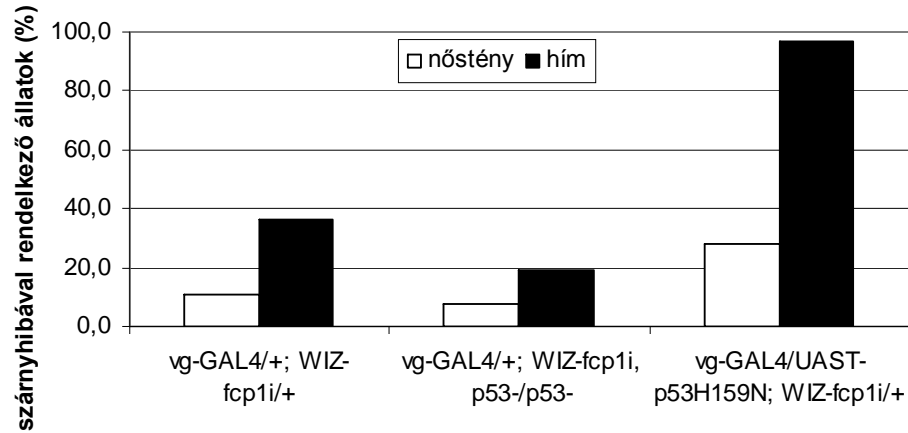
A dmfcpl túltermelő és csendesítő transzgén működése apoptózist okoz  
szárnydiszkuszokban

Acridin-orange festés L3 stádiumú lárvákból származó szárnydiszkuszokon. Az apoptotizáló sejtek sárgászöld pontként látszanak. A transzgéneket csak ebben a szövetben kifejeződő vestigial-GAL4 driverrel voltak meghajtva. **a**, vad típus; **b**, vg-GAL4 x WIZ-fcp1i; **c**, vg-GAL4 x UAST-fcp1c

#### IV. 5. A csendesítő transzgén okozta apoptózis p53 függő útvonalon valósul meg

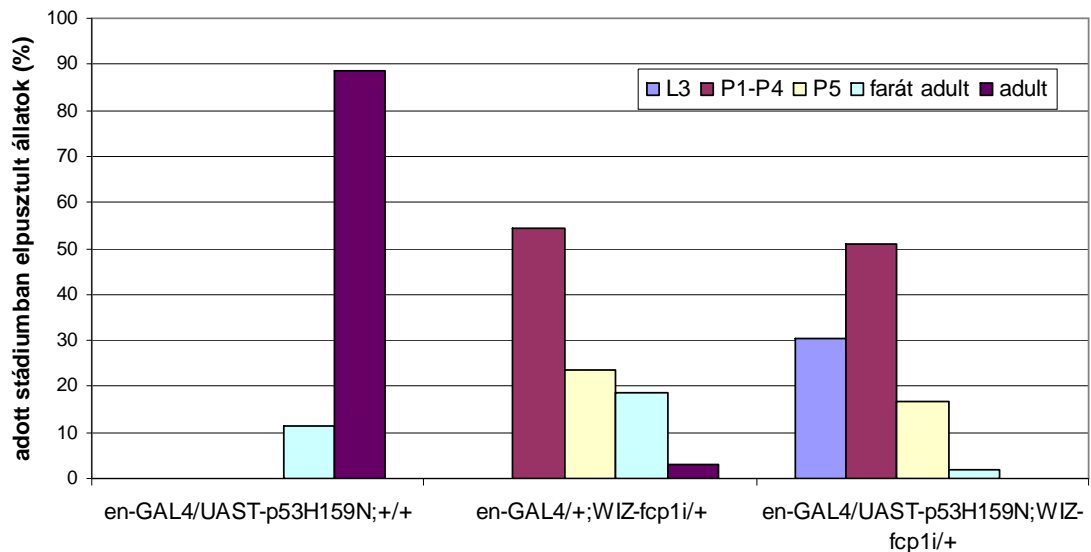
A p53 fehérjéről ismert, hogy az apoptotikus útvonalakban kulcsszerepet játszik, ezért megvizsgáltam, hogy az általunk tapasztalt apoptózisban szerepet játszik-e. Először megvizsgáltam a p53 hiányának hatását a csendesítő transzgén által okozott fenotípusra. Ezekben a kísérletekben a csendesítő transzgént vestigial-GAL4 driverrel hajtottam meg, amely a szárnyban fejeződik ki. A fenotípus erősségének mértékeként a kicsípett szárnyal rendelkező egyedek százalékos arányát határoztam meg. A kontroll törzs vad (w1118) háttéren tartalmazta a transzgént és drivert. A második törzs p53 null mutáns, ugyanis homozigóta formában hordoz egy deléciót, mely eltávolítja a p53 gént. Ebben az esetben tapasztalt fenotípus enyhébb volt a kontrollnál látotthoz képest, mivel kevesebb kicsípett szárnyú legyet láttam. A hím állatok nagyobb arányban mutatták ezt a fenotípust. A harmadik törzs a csendesítő transzgén mellett pontmutáns p53 (H159N) túltermelő konstrukciót is hordoz. A H159N mutáció domináns negatív hatású, a DNS-kötő doménben található, és lehetetlenné teszi, hogy a p53 kapcsolódni tudjon a megfelelő szabályzóelemekhez, meggátolva ezzel a p53 célgénjeinek aktiválását. A domináns negatív hatás annak a következménye, hogy a p53 tetramer formában tölti be funkcióját. Amennyiben a tetramerben H159N mutáns és vad típusú p53 is található, akkor a vad típus sem képes szerepét betölteni. A H159N mutáció önmagában nem befolyásolja az állatok fejlődését, de a csendesítő transzgénnel együtt kifejezve azt tapasztaltam, hogy a szárnyfenotípus nem csak gyakrabban fordul elő, de súlyosabban is jelenik meg. **(10. ábra)**

Megvizsgáltam továbbá, hogy a p53 pontmutáns túltermelése megváltoztatja-e az engrailed-GAL4 driver hatására bekövetkező letalítás fejlődési stádiumát. A p53H159N önmagában való túltermelése itt is a vad típushoz hasonló eredményt adott, míg a két transzgén együttes kifejeződésakor a letálfázis korábbi stádiumokra tolódott: ha csak a csendesítő transzgén és az en-GAL4 driver volt jelen, akkor a letalítás elsőként a bábállapotban jelent meg, itt volt a legnagyobb mértékű, de az állatok kis része ki is kelt. Amennyiben a p53H159N-et túltermelő transzgén is jelen volt, úgy már a késői L3 lárvállapotban is pusztulást tapasztaltam, teljesen kifejlett légy nem volt, farát adult stádiumba is csak minimális számú állat jutott el. **(11. ábra)**



**10. ábra**

A p53 mennyisége befolyásolja a csendesítő transzgén által okozott fenotípus súlyosságát. A szárnydiszkuszkokban kifejeződő vestigial-GAL4 driver-rel meghajtott csendesítő transzgént hordozó állatok fenotípusa enyhül p53 null mutáns háttéren, viszont erősödik, amennyiben a p53 H159N pontmutánsa is túl van termelve a szövetben.



**11. ábra**

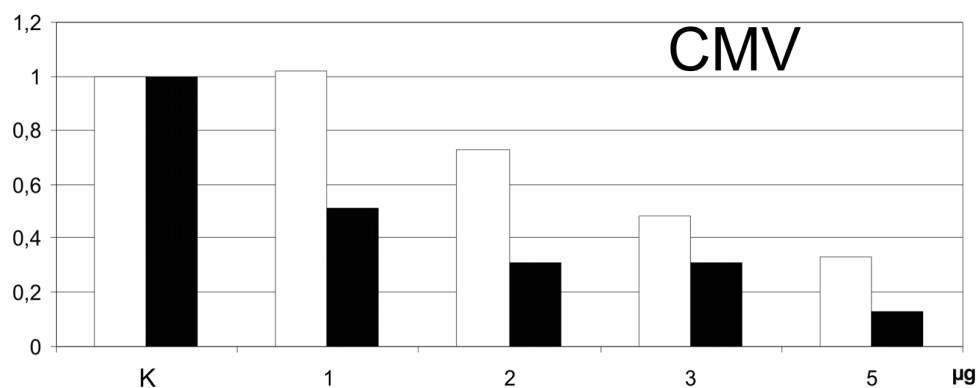
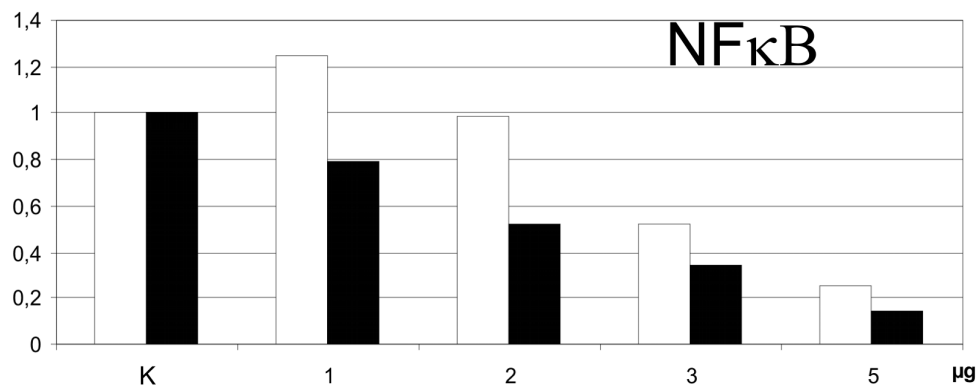
A domináns negatív p53 H159N túltermelésének hatására az engrailed-GAL4 driverrel meghajtott csendesítő transzgén által okozott letalitás korábbi stádiumokra tolódik. Az L és P a különböző lárva- ill. bábállapotokat jelölik.

#### IV. 6. A DmFcp1 befolyásolja a transzkripciót HeLa sejtekben

Az Fcp1 fehérje minden eukariótában megtalálható, funkciója a transzkripció folyamatában alapvető. Mivel a *Xenopus* Fcp1 komplementálta a *Drosophila* Fcp1 hiányát, ezért megvizsgáltam, hogy vajon a szekvenciában mutatkozó, viszonylag alacsony homológia ellenére képes-e a DmFcp1 emlős sejtek transzkripcióját megváltoztatni. A transzkripció aktivitás követésére luciferáz enzimet kódoló plazmidot juttattam HeLa sejtekbe. Ezáltal a luciferáz a sejtekben termelődik, és amennyiben az Fcp1 túltermelése befolyásolja a HeLa sejtek transzkripcióját, akkor a luciferázaktivitás is megváltozik.

A DmFcp1 genomi klónját, valamint a már fentebb említett R251G pontmutánst pcDNA3 eukarióta expressziós vektorba építettem, és a luciferáz enzimet kódoló riporterplazmidokkal együtt transzfektáltam őket HeLa sejt vonalba. A luciferáz kifejeződés szabályozására három különböző promoterű riporterplazmidot használtam: CMV-, NfκB-, és hősokkpromoter. A DmFcp1-et egy-egy kísérletben több különböző mennyiségben juttattam be a sejtekbe, ezáltal a megfigyelni kívánt változás dózisfüggése is megállapítható. A bejuttatott DNS-keveréket minden esetben kiegészítettem pHC624 plazmid DNS-sel, mely azt a célt szolgálta, hogy a különböző mintákkal azonos mennyiségű DNS-t juttassak a sejtekbe, elkerülendő, hogy a különböző DNS mennyiségek esetleg eltérő mértékben befolyásolják a sejtek transzfekció utáni túlélését. A DmFcp1 HeLa sejt transzkripciójára kifejtett hatására a bejuttatott plazmid luciferázexpressziójának változása alapján következtettem. A CMV és NfκB promoterek esetében azt tapasztaltam, hogy kis mennyiségben (1 µg) bejuttatott pcDNA3-fcp1g nem befolyásolta jelentősen a transzkripció aktivitását, inkább kismértékű aktivitásnövekedést láttam, ám nagyobb mennyiség (2-5 µg) esetében a luciferáz expresszió arányosan lecsökkent. A pontmutáns már kis mennyiségben is gátolta a transzkripciót. **(12. ábra)** Hősokkpromoter esetében mind a vad típusú, mind a mutáns DmFcp1 ektópikus expressziója a legkisebb használt plazmidmennyiségben (1 µg) is a luciferázaktivitás csökkenéséhez vezetett.





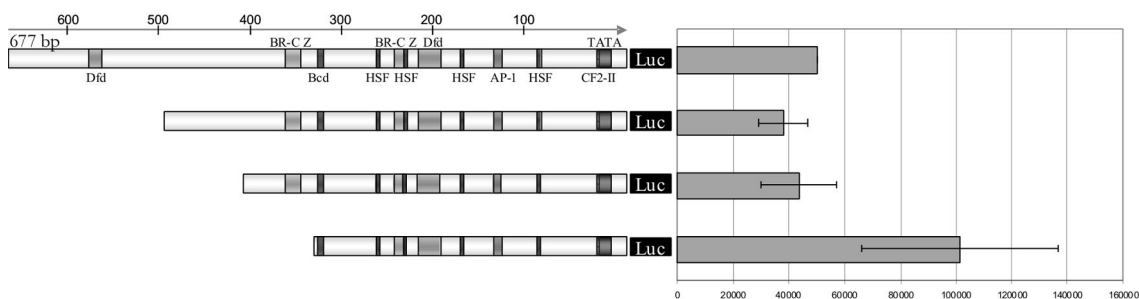
### 12. ábra

A DmFcp1 túltermelése befolyásolja a HeLa sejtek transzkripcióját

DmFcp1 (fehér) és DmFcp1<sup>R251G</sup> (fekete) túltermelés hatása HeLa sejtek transzkripciójára NFκB és CMV promoteren. Minden minta 1 μg riporter (luciferáz expresszázó) plazmidot, valamint különböző mennyiségű DmFcp1/DmFcp1<sup>R251G</sup> expresszázó plazmidot tartalmazott: 0 (K - kontroll), 1, 2, 3 és 5 μg.

#### IV. 7. A dmfcpl1 gén promoterének vizsgálata

Az *Drosophila*-ban végzett *in vivo* kísérletekben megfigyeltem, hogy a DmFcpl1 szintjének csökkentése és növelése is megzavarta az állatok fejlődését, így arra következtettem, hogy a fehérje szintje szigorúan szabályozott. Ezért megvizsgáltam a Dmfcpl1 gén promoterét. Egy 677 bp hosszú fragmentumot, melyről feltételeztem, hogy tartalmazza a gén szabályzó régióját, PCR reakció segítségével izoláltam, és luciferáz, ill. GFP gén elé építve kimutattam, hogy ebben az esetben ezek a fehérjék expresszálnak S2 *Drosophila* sejtekben. A promoterrégió pontosabb meghatározásához rövidítettem az eredeti méretet: több rövidebb fragmentumot is létrehoztam PCR-rel, melyeket szintén luciferáz gén elé építettem. Ezek az eredeti 677 bp hosszú fragmentum 495-1 (182-677), 396-1 (281-677), ill. 322-1 (355-677)-ig terjedő régióját foglalták magukba. Mint a **13. ábrán** látható, az általam vizsgáltak közül a legrövidebb mutatta a legmagasabb aktivitást, ami arra enged következtetni, hogy a 396-322 szakaszon egy gátló transzkripció faktor kötőhelye található. A fragmentumokon feltüntettem a TFSEARCH program által feltételezett transzkripció faktorok kötőhelyeit: Dfd – deformed, BR-C Z – broad komplex Z, Bcd – bicoid, HSF – hősokk faktor, AP-1 - activator protein 1, CFII-2 - cleavage factor II-2, és a TATA boks szekvencia.



**13. ábra**

A különböző hosszúságú dmfcpl1 promoter fragmentumok transzkripció aktivitása  
A grafikonon feltüntetett luciferáz aktivitás önkényes egységekben van megadva.

## **V. Eredmények megvitatása**

A transzkripció a génkifejeződés egyik legfontosabb lépése, szabályozásának megismerése alapvető minden életfolyamat molekuláris szintű megértéséhez. A fehérjék génjeit átíró RNS polimeráz II működése alapjaiban már ismert, ám finomszabályozása jelenleg is intenzíven kutatott terület. A CTD ismétlődéseinek különféle módosításai nagyszámú szabályozó kombinációt tesznek lehetővé, melyek funkciója még csak kevésbé ismert. Az Fcp1 a CTD-n lejátszódó foszforilációs-defoszforilációs ciklus egyik kulcsfehérjéje, fontosságát bizonyítja, hogy mutációja élesztőben letális, emberben veleszületett rendellenességet okoz [74]. A szakirodalomban közölt eddigi vizsgálatok leginkább e két organizmusban vizsgálták az Fcp1-et, tehát egy alacsonyabbrendű eukariótában, ill. humán sejtenyészetekben, *semi-in vivo* módon. A *Drosophila*, mint modellorganizmus kiválóan alkalmas arra, hogy egy adott folyamatot *in vivo* tanulmányozhassunk, genetikai és molekuláris biológiai módszerekkel, de ez idáig ilyen kutatásokat nem végeztek.

Az Fcp1 *Drosophila melanogaster* ortológja viszonylag alacsony azonosságot mutat a humán ortológgal. A legnagyobb hasonlóság a két funkcionális doménben látható, ezek evolúciósan konzerváltak. A doméneken kívüli szakaszok alacsony homológiája azt sugallja, hogy ezek sem strukturálisan, sem funkcionálisan nem játszanak jelentős szerepet a fehérje működésében.

Az Fcp1 szerkezete és a CTD defoszforilálásának mechanizmusa intenzíven kutatott terület. A szakirodalomban egymásnak ellentmondó eredmények láttak napvilágot az Fcp1 és az RNS polimeráz II kölcsönhatását illetően: Az ún. „docking-site” modell szerint az Fcp1 a polimeráz Rpb4 alegységével kapcsolódik, és ezáltal térközelbe kerül a foszfátcsoportok eltávolításához. A „distributive” modell szerint azonban ennek a kölcsönhatásnak nincs szerepe a defoszforilálásban, és az Fcp1 nem kapcsolódik stabilan a polimerázhoz. Az élesztő és humán Rpb4-Fcp1 közötti kölcsönhatásokat korábban kimutatták, ezt a *Drosophila* Fcp1 esetében is megfigyeltem. A kapcsolódásért felelős régió az Fcp1 C-terminálisán található, ahol – humán Fcp1-nél – a TFIIF RAP74 alegységével való kölcsönhatás is történik. Ugyanez a rész aktivációs doménként is működik, hiszen az élesztő két-hibrid kísérletekben minden olyan LexA-Fcp1 konstrukció önmagában hamis pozitív „kölcsönhatást” mutatott, amely tartalmazta ezt a szekvenciát. Az aktiváló hatás valószínűleg éppen a TFIIF-fel való kapcsolódás miatt következik be, hiszen ez az adott helyen elősegíti a transzkripció gépezet

összeszerelődését.

A DmFcp1 UAS/GAL4 rendszerrel történő *in vivo* szintjének megváltoztatása során azt tapasztaltam, hogy általánosan kifejeződő driverek esetében mind túltermeléskor, mind csendesítéskor az állatok elpusztultak. Ez azt sugallja, hogy az Fcp1 szintje szigorúan szabályozott, és a normális szinttől mindkét irányba való eltérés lehetetlenné teszi a transzkripció normális lefolyását. Az egyes általános GAL4 driverek által mutatott letálfázis különbségek annak tudhatók be, hogy egyrészt a driverek nem egyforma erősségűek, másrészt az egyedfejlődés során valószínűleg más-más időpontban indul be expressziójuk. Szövetspecifikus driverek használatakor szintén elváltozások tapasztalhatók, bár általában kevésbé súlyosak, és nem minden driver esetében mutatkoznak meg; ez valószínűleg ezen driverek alacsonyabb aktivitásával magyarázható, ill. hogy adott szervek/szövetek működése nem létfontosságú (pl. szárnyak). A túltermelő és csendesítő transzgén együttes kifejezése nem okoz letalitás vagy bármilyen változást. A két ellentétes hatás együttesen az endogénhez hasonló mRNS szintet állít be, és ezért nem befolyásolja az állatok túlélését. Ez az eredmény azt is alátámasztja, hogy a használt transzgének az elvárásoknak megfelelően működnek, és a tapasztalt fenotípusok nem mesterséges melléktermékek. Az R251G pontmutációt (mely egy esszenciális aminosav az *S. pombe* ortológban a foszfatázaktivitás szempontjából) hordozó Fcp1 túltermelése nem okoz semmilyen változást az állatokban, ami azt bizonyítja, hogy vad típusú Fcp1 túltermelése esetén tapasztalt fenotípusok a megnövekedett foszfatázaktivitásnak tulajdoníthatók, nem pedig a fehérje esetleges egyéb funkciójának, vagy egy aspecifikus (pl. toxikus) hatásnak.

Vizsgálataim során kimutattam, hogy a *X. laevis* Fcp1 túltermelése képes komplementálni a csendesítő transzgén által okozott fenotípust. A *X. laevis* és *D. melanogaster* ortológok DNS szekvencia szinten csak kis hasonlóságot mutatnak, így feltételezhető, hogy az RNS interferencián alapuló csendesítés nem érinti a túltermelt Xlfcp1-et, tehát a gén kifejeződik, és terméke menekíteni képes az ektópusan lecsökkentett DmFcp1 szintet. Fehérjeszekvencia szinten a két ortológ között a legnagyobb hasonlóság a foszfatázdoménben látható, és valószínűleg ez a homológia elegendő ahhoz, hogy a *Xenopus* ortológ funkcionálisan helyettesítse az endogén fehérjét. A foszfatáz domén szerepét az is megerősíti, hogy a D181E mutáns – mely defoszforilálásra képtelen – nem képes a fenotípus helyreállítására. Ezeket figyelembe véve (a komplementáció tényét, a foszfatázdomén épségének szükségességét, valamint a két ortológ közötti, a foszfatázdoménen kívüli azonosság/hasonlóság viszonylag alacsony fokát) az alábbi következtetéseket vontam le: az Fcp1 működésének szempontjából a foszfatáz domén integritása a legfontosabb, a fehérje többi része csak kisebb mértékben járul

hozzá funkciójához. Az élesztő két-hibrid kísérletekben kimutattam, hogy a DmFcp1 C-terminális része felelős az Rpb4-hez való kapcsolódásért. Mivel ebben a régióban DmFcp1 és XlFcp1 csak kis hasonlóságot mutat, így feltételezhető, hogy a XlFcp1 nem képes a DmRpb4-hez kötődni. Amennyiben így van, úgy feltételezhető, hogy ez a kölcsönhatás nem szükséges az Fcp1 által végzett defoszforilációhoz, hiszen a XlFcp1 is képes a DmFcp1 *in vivo* funkcióját átvenni. Ez a feltételezés az élesztő két-hibrid kísérleteknél tárgyalt „distributive” modellt erősítené meg. Másrészt ez a kísérlet azt sugallja, hogy az Fcp1 funkcionálisan erősen konzervált, hiszen az evolúciósan távoli *Xenopus laevis* fehérje képes a *Drosophila* Fcp1 szerepét átvenni.

Az Fcp1 hibás működése (hiánya vagy túlzott aktivitása) az RNS polimeráz II által végzett transzkripció elakadásához vezet, és a szakirodalomból ismert, hogy ez apoptózist eredményez. Az apoptózis egyik legjobban ismert fehérjéje a p53, bizonyos esetekben célgénjeit aktiválva hajtja végre feladatát. Amennyiben transzkripciós blokk jön létre, tehát a génexpresszió leáll, úgy nem lehetséges a célfehérjék megjelenése sem (sem p53-on, sem más faktoron keresztül). A p53 képes transzkripciótól függetlenül is apoptózist kiváltani: a mitokondriumokba helyeződik át, permeabilizálja a membránt, és citokróm c kiáramlást okoz, ami beindítja a sejthalál folyamatát [75]. Feltételezhető, hogy az Fcp1 okozta fenotípusok megjelenéséért is a transzkripció-független út a felelős. Ezt támasztja alá az is, hogy amennyiben a H159N (transzkripció aktivációra képtelen) pontmutánst is túltermeltem a vizsgált rendszerben, akkor súlyosabb fenotípust tapasztaltam. Itt minden bizonnyal arról van szó, hogy a megnövekedett p53 szint intenzívebb apoptózishoz vezet.

A DmFcp1 HeLa sejtekben való túltermelése során azt tapasztaltam, hogy a viszonylag alacsony homológia ellenére – a *X. laevis* ortológához hasonlóan – a DmFcp1 képes befolyásolni HeLa sejtek transzkripcióját. Kis mennyiségű DmFcp1 túltermelésekor nem tapasztaltam változást (ill. nem jelentős mértékű növekedés volt látható), nagyobb mennyiségeknél a transzkripciós aktivitás csökkenése következett be. Ez magyarázható azzal, hogy a DmFcp1 kis mértékben képes ellátni a hFcp11 funkcióját, de kevésbé hatékonyan, így amikor a DmFcp1 nagy koncentrációban van jelen, akkor már gátló hatást fejt ki, mert verseng az endogén fehérjével a kötőhelyekért. A foszfatázdoménben pontmutációt hordozó DmFcp1 már kis koncentrációban is gátolja a HeLa sejtek transzkripcióját, valószínűleg azért mert funkcionálisan teljesen inaktív, és szintén „kiszorítja” a hFcp11-et. A hősokk promoteren tapasztalt csökkenés (tehát hogy minden koncentrációban gátol) azzal magyarázható, hogy a szakirodalomban megjelent eredmények alapján, amikor hősokk éri a sejtet, akkor az Fcp1 magi mátrixhoz kötődve inaktiválódik, mivel a hősokk promoterek által szabályozott gének

átírásának a magasabb CTD foszforilációs szint kedvez.

A *dmfcp1* gén előtti szakasz vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy az általam vizsgált legrovidebb szakasz mutatta a legnagyobb aktivitást. Fontos megemlíteni, hogy a *dmfcp1* gén startpontjától 86 bázispárra kezdődik egy másik gén, ellenkező orientációban. Így lehetséges, hogy ezen gén promoterének ellentétes irányú transzkripció aktivitása csökkenti a *dmfcp1* promoter aktivitását, és ez az oka, hogy a hosszabb fragmentumok által mutatott alacsonyabb értékeknek. Természetesen az is előfordulhat, hogy ebben a régióban kötődő gátló faktorok miatt csökken az aktivitás.

Vizsgálataim során egy olyan rendszert állítottam fel transzgének segítségével, mellyel *Drosophila melanogaster*-ben *in vivo* vizsgálható a DmFcp1 transzkripcióban betöltött szerepe. A *Drosophila* genetika rendkívül gazdag és nagy múltra visszatekintő módszertára lehetőséget nyújt arra, hogy egy magasabb rendű eukariótában *in vivo* kísérletekkel több szempontból is vizsgálhassuk ennek az esszenciális fehérjének a működését, ezáltal jobban megértsük a transzkripció folyamatának ma még homályos részleteit. A CTD foszforilációs mintázatának jelentősége, szerepe még sok fehér foltot tartalmaz melyek nélkül a génexpresszió teljes folyamata sem ismerhető meg.

## VI. Összefoglalás

Az eukarióta szervezetekben a fehérjekódoló géneket az RNS Polimeráz II (RNAPII) írja át. Legnagyobb alegysége (Rpb1) a C-terminálisán sajátos domént tartalmaz, ami a Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser konszenzus szekvencia tandem ismétlődéseiből áll. Az ismétlődések száma a különböző élőlényekben eltérő (26 élesztőben, 52 emberben), de a szekvencia konzervált. Ez a C-terminális domén (CTD) a sejtek életbemaradásához nélkülözhetetlen. Számos vizsgálat bebizonyította, hogy a CTD nagymértékben foszforilálódhat, és a foszforiláltság foka nem állandó. Az RNAP II két jól elkülöníthető konformációs állapota az RNAP IIO (hiperfoszforilált) és az RNAP IIA (hipofoszforilált), melyeknek más a funkciója a transzkripció során. A IIA formában az enzim képes a promoteren összeszerelődött preiniciációs komplexbe beépülni. A CTD foszforilálása az iniciáció során történik, és lehetővé teszi a polimeráz promoterről való elindulását, vagyis az elongációt a IIO forma végzi. Ahhoz, hogy az enzim újra átírásba kezdhesen, a CTD-nek defoszforilálódnia kell. A CTD ezen kívül kötőhelye az RNAP II-vel kölcsönható fehérjék egy részének, melyek kötődését befolyásolja a CTD foszforiláltsági mintázata. Tehát a CTD kinázoknak és foszfatáz(ok)nak rendkívül fontos szerepük van a génexpresszió szabályozásában. Több CTD-t módosító kinázt, és néhány foszfatázt már azonosítottak, utóbbiak közül a legismertebb a TFIIF-el kapcsolódó CTD-foszfatáz, az Fcp1.

Az Fcp1-et eddig elsősorban élesztőben vizsgálták *in vivo* alkalmazható módszerekkel, magasabbrendű eukariótákból főleg csak *in vitro* nyert eredmények állnak rendelkezésre, ezért kutatásom során egy olyan rendszert hoztam létre, melynek segítségével *in vivo* információkat nyerhetünk az Fcp1 szerepéről magasabbrendű szervezetekben. Modellorganizmusként a *Drosophila melanogaster*-t használtam, mert nagyszámú genetikai és biokémiai módszer áll rendelkezésre ezen élőlény vizsgálatához.

A *D. melanogaster* Fcp1 fehérjéről eddig nem közöltek eredményeket, ezért azonosítani kellett az enzim *Drosophila* homológját. A BLAST keresőprogram segítségével meghatároztam a dFcp1-et kódoló gént (CG12252), ezután a cDNS és genomi szekvenciát klónoztam.

A szakirodalom szerint az élesztő és humán Fcp1 kölcsönhat az RNAP II 4. legnagyobb alegységével, az Rpb4-gyel. Élesztő két-hibrid módszerrel kimutattam, hogy az általam azonosított CG12252 gén terméke szintén képes kapcsolódni a dRpb4-hez, valamint hogy a DmFcp1 C-terminálisán egy transzkripció-aktiváló domént tartalmaz. Ezt szintén

kimutatták más Fcp1 ortológok esetében is.

Az Fcp1 mennyiségének *in vivo* változtatása céljából transzgenikus *Drosophila* törzseket hoztam létre; a transzgénnek az UAS-GAL4 rendszerrel fejezhető ki. Ez a rendszer lehetővé teszi adott szekvenciák szövet- és/vagy fejlődési stádium-specifikus expresszióját. Az fcp1 gént *Drosophila melanogaster*-ben túltermeltetve, vagy az endogén Fcp1 szintet RNS interferenciával lecsökkentve azt tapasztaltam, hogy az állatok különböző fejlődési stádiumokban elpusztulnak, vagy adott szerveiken defektusokat hordoznak, az alkalmazott GAL4-forrás függvényében. A megfigyelt fenotípusok arra engedtek következtetni, hogy az állatokban apoptózis játszódik le. Acridin-orange festéssel kimutattam, hogy valóban erről van szó, a mutánsok azon szöveteiben, ahol az Fcp1 szint megváltozik, nagyszámú apoptotizáló sejtet láthatunk.

Az apoptózis mechanizmusának egyik kulcsfehérjéje a p53, ezért felmerült a kérdés, hogy a megváltozott Fcp1 szint okozta fenotípusok kialakulásában szerepet játszik-e a p53. Kimutattam, hogy p53 hiányában az Fcp1 szint csökkenés hatására kialakuló fenotípusok enyhülnek, míg abban az esetben, ha túltermeltem egy domináns negatív hatású (transzkripció-aktivációra képtelen) p53-at, a fenotípusok súlyosbodnak. A domináns-negatív p53 nem képes az apoptotikus kaskádban részt vevő célgénjeit aktiválni, közreműködhet azonban transzkripciót nem igénylő apoptózis indukálásában. Mivel az Fcp1 szint változása a transzkripciót globálisan gátolja, így egy transzkripciófüggő apoptotikus útvonal nem lehetne hatékony, viszont transzkripciótól független úton lejátszódhat az apoptózis.

Az Fcp1 konzervált funkciója felvetette a kérdést, hogy képes-e egy adott ortológ más rendszerben hatást kifejteni. A HeLa sejtvonalon végzett kísérletek megmutatták, hogy a DmFcp1 gátolja a sejtek transzkripcióját, az R251G (foszfátázdoménben) pontmutációt hordozó változat pedig a vad típusnál kisebb mennyiségben is aktivitáscsökkenést okoz. Ennek oka valószínűleg az endogén és az ektópikus fehérjék kompetíciója.

A dmfcpl gén promoterének további analízise fényt derít arra, hogy milyen faktorok befolyásolják a DmFcp1 szintjének változását az egyedfejlődés során, ill. a különböző szövetekben.

Vizsgálataimmal bizonyítottam, hogy az Fcp1 helyes működése elengedhetetlen a *D. melanogaster* normális egyedfejlődéséhez. Mennyisége szigorúan szabályozott, hiszen expressziója szintjének növelése, vagy kismértékű csökkentése is az állatok halálához vagy hibás szövetek/szervek kialakulásához vezet. Ezen defektusok a transzkripció helyes működésének akadályoztatása révén jönnek létre, mely esetben az érintett sejtek apoptotizálnak. Ebben a folyamatban a p53 fontos szerepet játszik, célgénjeinek aktiválása



nélkül, transzkripció-független úton. Kísérleteim során létrehoztam egy olyan rendszert, mellyel az Fcp1 funkciója és a CTD foszforilációjának szerepe *in vivo* vizsgálható egy magasabbrendű eukariótában.

## **VII. Summary**

The enzyme responsible for the transcription of protein-encoding genes in eukaryotic organisms is RNA Polymerase II (RNAP II). Its largest subunit (Rpb1) contains a unique domain on its C-terminus, consisting of tandem repeats of the Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser consensus sequence. The number of repeats varies among organisms (26 in yeast, 52 in human), but the sequence is conserved. This C-terminal domain (CTD) is essential for cell viability. Many studies proved that the CTD can be highly phosphorylated, and the level of phosphorylation is not constant. RNAP II has two well defined conformational states: RNAP IIO (hyperphosphorylated) and RNAP IIA (hypophosphorylated), which have different functions during transcription. In IIA form the enzyme is able to bind into the preinitiation complex that assembles on the promoter. Phosphorylation of the CTD happens during initiation, and allows promoter clearance, thus elongation is done by the IIO form. The CTD has to be dephosphorylated in order for the enzyme to be able to start another round of transcription. In addition, the CTD is a binding site for a number of proteins that interact with the RNAP II, whose binding is influenced by the pattern of phosphorylation on the CTD. This means, that CTD kinases and phosphatases have a cardinal role in gene expression regulation. Many CTD modifying kinases and a few phosphatases have been identified, from the latter group the most well known is the TFIIF interacting CTD phosphatase, Fcp1.

Fcp1 has mainly been studied with *in vivo* methods in yeast, from higher eukaryotes mostly only *in vitro* results are available. During my research I created a system, with which I can get *in vivo* information about the role of Fcp1 in a higher organism. As model I chose the *Drosophila melanogaster*, because of the large number of genetic and biochemical methods available to study it.

Since there was no data on the *D. melanogaster* orthologue of Fcp1, it had to be identified first. I identified the gene encoding dFcp1 (CG12252) with the BLAST search engine, then cloned the cDNA and genomic sequence.

According to the literature, yeast and human Fcp1 interact with Rbp4, the fourth largest subunit of RNAP II. I showed with yeast two hybrid experiments, that the product of the gene which I identified – CG12252 – is also able to bind to DmRBP4. Furthermore I found that DmFcp1 contains a transcription activation domain on its C-terminus. This also coincides with other studies of Fcp1.

To influence the level of Fcp1 *in vivo*, I created transgenic *Drosophila* lines; the

transgenes can be expressed with the UAS/GAL4 system. This system makes it possible to express a given sequence with spatial and/or temporal specificity. In *Drosophila melanogaster* both the overexpression and the silencing of the *dmfcp1* gene causes lethality or the animals develop different aberrations on certain organs, depending on the type of GAL4 driver used. The observed phenotypes suggest that apoptosis occurs in the affected animals. I showed with acridine-orange staining that this is indeed the case. In those tissues, where the level of Fcp1 has been changed, a large number of cells can be seen in apoptosis.

A key protein in apoptosis is p53, so we raised the question, whether p53 has a role in the phenotypes caused by the change in Fcp1 level. We showed that in the absence of p53 the phenotypes of decreased Fcp1 level are less severe, while if we overexpress a dominant-negative form of p53 (one which is unable to activate transcription) the phenotypes get more severe. This dominant-negative p53 cannot activate the transcription of its target genes that are components of the apoptotic cascade, but it can take part in the induction of apoptosis in a transcription-independent manner. In this case this is understandable, in light of the assumption that the change in Fcp1 level would block transcription in general, making a transcription-dependent pathway ineffective.

The conserved function of Fcp1 raised the question, whether a given orthologue would be able to have an effect in another organism. Cell culture experiments indicate that overexpression of DmFcp1 can inhibit transcription of HeLa cells, and the R251G point mutant (in the phosphatase domain) decreases the transcription activity even in smaller quantities. This might be caused by a competition of endogenous and ectopic proteins.

Further analysis of the promoter of *dmfcp1* can shed light on the different factors that regulate the level of Fcp1 during development and in different tissues.

My results show that the correct function of Fcp1 is essential for the normal development of *D. melanogaster*. Its level is tightly regulated, since both the overexpression and the silencing of its gene leads to the death of the animals or to the development of aberrant tissues/organs. These defects are caused by the blockage of normal transcriptional events, in which case the cell undergo apoptosis. The tumor suppressor p53 plays an important role in this, without activating its target genes, by a transcription-independent pathway. I created a system, in which the function of Fcp1 and the role of CTD phosphorylation can be investigated *in vivo* in a higher eukaryote.

## **VIII. Rövidítések jegyzéke**

Ad2-MLP: adenovírus 2 fő késői promoter  
Cdk7: ciklinfüggő kináz 7  
CKII: kazein kináz II  
CPB: CREB-kötő fehérje  
CREB: cAMP-reszponzív elem kötő fehérje  
CTD: C-terminális domén  
DmFcp1: az Fcp1 fehérje Drosophila melanogaster ortológja  
DRB: d-ribofuranosilbenzimidazol  
Fcp1: TFIIF-fel kapcsolódó CTD foszfatáz  
GAL4: galaktóz által aktivált géneket szabályzó faktor S. cerevisiae-ben  
H3K4: a hiszton 3 fehérje 4. pozícióban lévő lizinje  
H3K36: a hiszton 3 fehérje 36. pozícióban lévő lizinje  
MAPK: mitogén-aktivált kináz  
NELF: negatív elongációs faktor  
TFIIB, -D, -E, -F, -H: általános transzkripció faktorok  
TBP: TATA-box kötő fehérje  
PCAF: p300/CPB asszociált faktor, lizin acetiltranszferáz 2B  
P-TEFb: pozitív transzkripció elongációs faktor b  
RAP30/74: a TFIIF alegységei  
RNAP II: RNS polimeráz II  
RNAP IIA: hipofoszforilált CTD-t tartalmazó RNS polimeráz II  
RNAP IIO: hiperfoszforilált CTD-t tartalmazó RNS polimeráz II  
Rpb1: az RNS polimeráz II legnagyobb alegysége  
Rpb4: az RNS polimeráz II 4. legnagyobb alegysége  
Ser2/5/7: a CTD heptapeptid ismétlődés 2./5./7. pozícióban lévő szerin  
Ser2/5/7-P: a CTD heptapeptid ismétlődés 2./5./7. pozícióban lévő foszforilált szerin  
SCP1: „small CTD-like phosphatase”  
SPT5: a DRB érzékenységi faktor nagy alegysége  
UAS: „upstream activation sequence”

## **IX. Köszönetnyilvánítás**

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Boros Imrének szakmai irányítását, hasznos tanácsait, valamint a dolgozatom átolvasását és észrevételeit. Hálásan köszönöm Ökrösné Katalin gyakorlati tanácsait és önzetlen segítségét, mellyel munkámhoz hozzájárult. Ez a kézirat nélkülük nem jöhetett volna létre. Ezen felül köszönettel tartozom csoportunk minden tagjának, mert lehetővé tették, hogy munkámat kellemes, vidám légkörben végezhettem.

## X. Irodalomjegyzék

1. Corden, J.L., et al., *A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(23): p. 7934-8.
2. Corden, J.L., *Tails of RNA polymerase II*. Trends Biochem Sci, 1990. **15**(10): p. 383-7.
3. West, M.L. and J.L. Corden, *Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations*. Genetics, 1995. **140**(4): p. 1223-33.
4. Phatnani, H.P., J.C. Jones, and A.L. Greenleaf, *Expanding the functional repertoire of CTD kinase I and RNA polymerase II: novel phosphoCTD-associating proteins in the yeast proteome*. Biochemistry, 2004. **43**(50): p. 15702-19.
5. Phatnani, H.P. and A.L. Greenleaf, *Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD*. Genes Dev, 2006. **20**(21): p. 2922-36.
6. Buratowski, S., *The CTD code*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(9): p. 679-80.
7. Corden, J.L., *Transcription. Seven ups the code*. Science, 2007. **318**(5857): p. 1735-6.
8. Cadena, D.L. and M.E. Dahmus, *Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of RNA polymerase II*. J Biol Chem, 1987. **262**(26): p. 12468-74.
9. Komarnitsky, P., E.J. Cho, and S. Buratowski, *Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription*. Genes Dev, 2000. **14**(19): p. 2452-60.
10. Price, D.H., *P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(8): p. 2629-34.
11. Cho, E.J., et al., *Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain*. Genes Dev, 2001. **15**(24): p. 3319-29.
12. Laybourn, P.J. and M.E. Dahmus, *Phosphorylation of RNA polymerase IIA occurs subsequent to interaction with the promoter and before the initiation of transcription*. J Biol Chem, 1990. **265**(22): p. 13165-73.
13. Lu, H., et al., *The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 10004-8.
14. Chesnut, J.D., J.H. Stephens, and M.E. Dahmus, *The interaction of RNA polymerase II with the adenovirus-2 major late promoter is precluded by phosphorylation of the C-terminal domain of subunit Ila*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10500-6.
15. Payne, J.M., P.J. Laybourn, and M.E. Dahmus, *The transition of RNA polymerase II from initiation to elongation is associated with phosphorylation of the carboxyl-*

- terminal domain of subunit IIa*. J Biol Chem, 1989. **264**(33): p. 19621-9.
16. Maxon, M.E., J.A. Goodrich, and R. Tjian, *Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: a model for promoter clearance*. Genes Dev, 1994. **8**(5): p. 515-24.
  17. Zhang, J. and J.L. Corden, *Identification of phosphorylation sites in the repetitive carboxyl-terminal domain of the mouse RNA polymerase II largest subunit*. J Biol Chem, 1991. **266**(4): p. 2290-6.
  18. Baskaran, R., M.E. Dahmus, and J.Y. Wang, *Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11167-71.
  19. Payne, J.M. and M.E. Dahmus, *Partial purification and characterization of two distinct protein kinases that differentially phosphorylate the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase subunit IIa*. J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 80-7.
  20. Chapman, R.D., et al., *Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7*. Science, 2007. **318**(5857): p. 1780-2.
  21. Patturajan, M., et al., *Growth-related changes in phosphorylation of yeast RNA polymerase II*. J Biol Chem, 1998. **273**(8): p. 4689-94.
  22. Schroeder, S.C., et al., *Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II*. Genes Dev, 2000. **14**(19): p. 2435-40.
  23. Gomes, N.P., et al., *Gene-specific requirement for P-TEFb activity and RNA polymerase II phosphorylation within the p53 transcriptional program*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 601-12.
  24. Peterlin, B.M. and D.H. Price, *Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb*. Mol Cell, 2006. **23**(3): p. 297-305.
  25. Medlin, J.E., et al., *The C-terminal domain of pol II and a DRB-sensitive kinase are required for 3' processing of U2 snRNA*. Embo J, 2003. **22**(4): p. 925-34.
  26. Bird, G., D.A. Zorio, and D.L. Bentley, *RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation is required for cotranscriptional pre-mRNA splicing and 3'-end formation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(20): p. 8963-9.
  27. Ni, Z., et al., *Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes*. Mol Cell, 2004. **13**(1): p. 55-65.
  28. Medlin, J., et al., *P-TEFb is not an essential elongation factor for the intronless human U2 snRNA and histone H2b genes*. Embo J, 2005. **24**(23): p. 4154-65.
  29. Meinhart, A., et al., *A structural perspective of CTD function*. Genes Dev, 2005. **19**(12): p. 1401-15.

30. Reyes-Reyes, M. and M. Hampsey, *Role for the Ssu72 C-terminal domain phosphatase in RNA polymerase II transcription elongation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(3): p. 926-36.
31. Egloff, S., et al., *Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression*. Science, 2007. **318**(5857): p. 1777-9.
32. Chapman, R.D., et al., *The last CTD repeat of the mammalian RNA polymerase II large subunit is important for its stability*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(1): p. 35-44.
33. Fong, N., et al., *A 10 residue motif at the C-terminus of the RNA pol II CTD is required for transcription, splicing and 3' end processing*. Embo J, 2003. **22**(16): p. 4274-82.
34. Xu, Y.X. and J.L. Manley, *Pinning down transcription: regulation of RNA polymerase II activity during the cell cycle*. Cell Cycle, 2004. **3**(4): p. 432-5.
35. Xu, Y.X. and J.L. Manley, *Pin1 modulates RNA polymerase II activity during the transcription cycle*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2950-62.
36. Kelly, W.G., M.E. Dahmus, and G.W. Hart, *RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10416-24.
37. Hampsey, M. and D. Reinberg, *Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation*. Cell, 2003. **113**(4): p. 429-32.
38. Berger, S.L., *The complex language of chromatin regulation during transcription*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 407-12.
39. Kizer, K.O., et al., *A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 3305-16.
40. Cho, H., et al., *A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5355-63.
41. Egloff, S. and S. Murphy, *Cracking the RNA polymerase II CTD code*. Trends Genet, 2008. **24**(6): p. 280-8.
42. Chambers, R.S. and M.E. Dahmus, *Purification and characterization of a phosphatase from HeLa cells which dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II*. J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26243-8.
43. Chambers, R.S., et al., *The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription factors IIF and IIB*. J Biol Chem, 1995. **270**(25): p. 14962-9.
44. Marshall, N.F., G.K. Dahmus, and M.E. Dahmus, *Regulation of carboxyl-terminal domain phosphatase by HIV-1 tat protein*. J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 31726-30.



45. Kim, W.Y. and M.E. Dahmus, *Immunochemical analysis of mammalian RNA polymerase II subspecies. Stability and relative in vivo concentration*. J Biol Chem, 1986. **261**(30): p. 14219-25.
46. Swanson, M.S., E.A. Malone, and F. Winston, *SPT5, an essential gene important for normal transcription in Saccharomyces cerevisiae, encodes an acidic nuclear protein with a carboxy-terminal repeat*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(8): p. 4286.
47. Yamaguchi, Y., et al., *Structure and function of the human transcription elongation factor DSIF*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 8085-92.
48. Kim, J.B. and P.A. Sharp, *Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 12317-23.
49. Lu, H., et al., *Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II*. Nature, 1992. **358**(6388): p. 641-5.
50. Feaver, W.J., et al., *Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIIK*. Cell, 1994. **79**(6): p. 1103-9.
51. Hengartner, C.J., et al., *Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases*. Mol Cell, 1998. **2**(1): p. 43-53.
52. Marshall, N.F. and D.H. Price, *Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12335-8.
53. Marshall, N.F., et al., *Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 27176-83.
54. Yamaguchi, Y., et al., *NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation*. Cell, 1999. **97**(1): p. 41-51.
55. Dubois, M.F., et al., *Enhanced phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II upon serum stimulation of quiescent cells: possible involvement of MAP kinases*. Embo J, 1994. **13**(20): p. 4787-97.
56. Venetianer, A., et al., *Phosphorylation state of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) in heat-shocked cells. Possible involvement of the stress-activated mitogen-activated protein (MAP) kinases*. Eur J Biochem, 1995. **233**(1): p. 83-92.
57. Bellier, S., et al., *Phosphorylation of the RNA polymerase II largest subunit during Xenopus laevis oocyte maturation*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1434-40.
58. Cisek, L.J. and J.L. Corden, *Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2*. Nature, 1989. **339**(6227): p. 679-84.
59. Gebara, M.M., M.H. Sayre, and J.L. Corden, *Phosphorylation of the carboxy-terminal repeat domain in RNA polymerase II by cyclin-dependent kinases is sufficient to inhibit transcription*. J Cell Biochem, 1997. **64**(3): p. 390-402.

60. Roy, R., et al., *The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor*. Cell, 1994. **79**(6): p. 1093-101.
61. Trigon, S., et al., *Characterization of the residues phosphorylated in vitro by different C-terminal domain kinases*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 6769-75.
62. Ramanathan, Y., et al., *Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences*. J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 10913-20.
63. Zhou, M., et al., *Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(14): p. 5077-86.
64. Kimura, M., H. Suzuki, and A. Ishihama, *Formation of a carboxy-terminal domain phosphatase (Fcp1)/TFIIF/RNA polymerase II (pol II) complex in Schizosaccharomyces pombe involves direct interaction between Fcp1 and the Rpb4 subunit of pol II*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(5): p. 1577-88.
65. Hausmann, S., H. Erdjument-Bromage, and S. Shuman, *Schizosaccharomyces pombe carboxyl-terminal domain (CTD) phosphatase Fcp1: distributive mechanism, minimal CTD substrate, and active site mapping*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 10892-900.
66. Li, Y., et al., *RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection*. Science, 1994. **263**(5148): p. 805-7.
67. Archambault, J., et al., *FCP1, the RAP74-interacting subunit of a human protein phosphatase that dephosphorylates the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II*. J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27593-601.
68. Lin, P.S., N.F. Marshall, and M.E. Dahmus, *CTD phosphatase: role in RNA polymerase II cycling and the regulation of transcript elongation*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2002. **72**: p. 333-65.
69. Fang, S.M. and Z.F. Burton, *RNA polymerase II-associated protein (RAP) 74 binds transcription factor (TF) IIB and blocks TFIIB-RAP30 binding*. J Biol Chem, 1996. **271**(20): p. 11703-9.
70. Fischer, J.A., et al., *GAL4 activates transcription in Drosophila*. Nature, 1988. **332**(6167): p. 853-6.
71. Brand, A.H. and N. Perrimon, *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development, 1993. **118**(2): p. 401-15.
72. Lee, Y.S. and R.W. Carthew, *Making a better RNAi vector for Drosophila: use of intron spacers*. Methods, 2003. **30**(4): p. 322-9.
73. Suh, M.H., et al., *Fcp1 directly recognizes the C-terminal domain (CTD) and interacts with a site on RNA polymerase II distinct from the CTD*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(48): p. 17314-9.

74. Varon, R., et al., *Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome*. Nat Genet, 2003. **35**(2): p. 185-9.
75. Speidel, D., *Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death*. Trends Cell Biol, 2009.